



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Detección y expresión de los receptores X retinoicos  
(RXR) en la mucosa yeyunal de crías de alpacas  
(Vicugna pacos)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Alessandra BOCANEGRA ATOCHE

**ASESOR**

Mg. Alberto MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Bocanegra, A. (2019). *Detección y expresión de los receptores X retinoicos (RXR) en la mucosa yeyunal de crías de alpacas (Vicugna pacos)*. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## **H0JA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS**

### **CÓDIGO ORCID DEL AUTOR**

0000-0002-4944-1611

### **CODIGO ORCID DEL ASESOR**

0000-0003-0112-9183

### **DNI DEL AUTOR**

46407462

### **DNI DEL ASESOR**

070011047

### **GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

Grupo de Investigación en Sanidad Acuicola: GRISANAC

### **INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN**

Innovate Perú: Proyecto N° 078 – InnovatePerú – IAPIP - 2017

### **UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS**

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Av. Circunvalación 28, San Borja 15021

Coordenadas geográficas: -12.081698, -76.987703

### **AÑO O RANGOS DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ**

Parte experimental: Agosto – Diciembre del 2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 07 de agosto de 2019**, a las **11:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0143-EPMV/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

MV Mg. Rivera Gerónimo Hermelinda  
MV. Mg Manchego Sayán, Alberto  
MV Mg. Luna Espinoza Luis Ramiro  
MV Mg. Huanca López Wilfredo

Presidente del Jurado  
Asesor de la Tesis  
Miembro del Jurado  
Miembro del Jurado

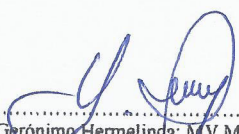
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **BOCANEGRA ATOCHE, ALESSANDRA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:


### **“DETECCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES X RETINOICOS (RXR) EN LA MUCOSA YEYUNAL DE CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)”;**

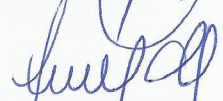
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.


Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:10 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

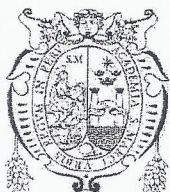
  
Rivera Gerónimo Hermelinda: MV Mg. Prof. Principal. D.E

  
Manchego Sayán Alberto: MV. Mg. Prof. Principal, D.E.

  
Luna Espinoza Luis Ramiro: MV. Mg. Prof. Auxiliar. D.E

  
Huanca López Wilfredo: MV. Mg. Prof. Principal D.E






UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

# Facultad de Medicina Veterinaria


ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0143-EPMV/FMV-2019.

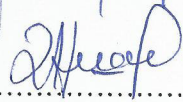
**PRESIDENTE:**

  
RIVERA GERÓNIMO HERMELINDA

**MIEMBROS :**

  
MANCHEGO SAYÁN, ALBERTO  
ASESOR DE LA TESIS

  
LUNA ESPINOZA LUIS RAMIRO

  
HUANCA LÓPEZ WILFREDO

San Borja, 20 de agosto de 2019

V° B°


**Dra. Daphne Ramos Delgado**  
Directora

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



## DEDICATORIA

A Dios por dejarme llegar hasta este momento  
Y porque con él y la fe nada es imposible.

A toda mi familia en la tierra  
y en el cielo, gracias  
por su apoyo y amor  
a lo largo de toda mi vida.

A mis mascotas que están ahora conmigo  
y por los que están en el cielo  
por su amor y fidelidad.

Para el Dr. Alberto Manchego por  
su enorme sentido del humor y su incondicional  
apoyo durante este proceso.

A mis verdaderos amigos por su ayuda  
en tratar de relajarme y ver las cosas  
de una manera más sencilla.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad  
de seguir adelante con todo y  
por cada día más de vida que nos das.

Al Dr. Manchego y al Dr. Miguel Rojas  
por apoyarme y ayudarme a lo largo  
de toda esta travesía.

Gracias a todos los que me enseñaron  
durante todo el año de estudio en esta  
linda carrera.

A quienes me ayudaron y estuvieron conmigo  
en todo este tiempo y hasta ahora siguen  
siendo parte de mi camino.



## ÍNDICE GENERAL

	PAG.
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de cuadros.....</b>	<b>X</b>
<b>Índice de anexos.....</b>	<b>XI</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
2.1 Respuesta inmune.....	2
2.2 Inmunidad en mucosas .....	3
2.3 Vitamina A .....	4
2.4 Ácido retinoico.....	5
2.5 Metabolismo de la vitamina A .....	6
2.6 Ácido retinoico y el sistema inmune .....	8
2.7 Receptores nucleares del ácido retinoico: RAR y RXR(RXRalfa, RXRbeta y RXRgamma).....	11
2.7.1 RAR.....	11
2.7.2 RXR.....	12
2.8 ALPACA.....	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración. ....	17
3.2 Descripción del material experimental.....	17
3.2.1 Animales .....	17
3.2.2 Equipos e Instrumental.....	18
3.2.3 Reactivos y Kits .....	18
3.2.4 Programas informáticos.....	18
3.3 Diseño experimental.....	19
3.3.1 Elaboracion de cebadores o primers.....	19
3.3.2 Procesamiento de las muestras.....	211
3.3.3 Extracción de ARN total .....	21

3.3.4	PCR .....	222
3.3.5	Síntesis de ADNc (transcripción reversa). ....	19
3.3.6	PCR a Tiempo Real.....	23
3.4	Análisis de la información.....	24
<b>IV.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
4.1	Análisis del gen RXRalfa en alpacas. ....	25
4.2	Análisis del gen RXRbeta en alpacas.....	26
4.3	Análisis del gen RXRgamma en alpacas.....	30
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>VII.</b>	<b>SUGERENCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>41</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## RESUMEN

En animales de laboratorio los metabolitos de la vitamina A son importantes en la regulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal. En alpacas se ha utilizado de forma experimental como adyuvante inmuno estimulante para incrementar la producción de Inmunoglobulina A e interleucinas asociadas a la respuesta humoral de mucosas. El presente estudio determinó la presencia de los genes de las isoformas de los receptores X retinoicos (RXR) en el genoma de alpacas adultas y su expresión en la mucosa yeyunal de las crías de alpaca. Para la determinación de los genes en el genoma de las alpacas se utilizaron muestras de leucocitos sanguíneos de 5 alpacas adultas para detectar los genes de las isoformas RXRalfa, RXRbeta y RXRgamma por PCR utilizando primers específicos, y para determinar la expresión de las isoformas de los genes RXR se utilizaron 35 muestras de yeyuno de crías de alpacas de diversas edades, a los cuales se les realizó la prueba de RT PCR tiempo real. Los productos del PCR y RT PCR tiempo real fueron secuenciados para determinar su especificidad. Se obtuvo el ADN total de los leucocitos sanguíneos utilizando un kit de extracción de ADN para luego realizar un PCR con primers específicos para cada gen de las isoformas de los receptores RXR alfa, RXRbeta y RXRgamma, para luego ser reveladas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. De las muestras de yeyuno se obtuvieron los ARN mensajeros (ARNm) totales con el kit de extracción de “SV total RNA isolation system” (promega) y tratados con DNAsa que sirvieron de molde para realizar RT-PCR tiempo real con primers específicos de los genes RXRalfa, RXRbeta y RXRgamma. Los resultados permitieron determinar que las alpacas tienen codificados las isoformas de RXR beta y gamma en su genoma y que tienen distintos grados de expresión en la mucosa yeyunal de crías de alpaca. Se detectó una alta expresión de RXRgamma y RXRbeta. No se pudo determinar la expresión de RXRalfa. Estos resultados indican que los receptores RXRgamma y RXRbeta se están expresando en la mucosa del yeyuno de crías de alpacas.

Palabras claves: receptores X retinoicos (RXR), PCR, RT PCR tiempo real, mucosa yeyunal, crías, alpacas.

## ABSTRACT

In laboratory animals the metabolites of vitamin A are important in the regulation of the immune response in the intestinal mucosa. In alpacas, it has been used experimentally as an immunostimulant adjuvant to increase the production of immunoglobulin A and interleukins associated with the mucosal humoral response, and the mechanisms of action and the modulation of this response have yet to be determined. The present study determined the presence of retinoic X receptor (RXR) isoform genes in the genome and its expression in the mucosa jejunal of alpaca pups. For the determination of the genes in the alpaca genome blood leukocyte samples from 5 adult alpacas were used to detect the genes of the RXRalpha, RXRbeta and RXRgamma isoforms by PCR, and to determine the expression of the isoforms of the RXR genes we used 30 samples of jejunum from alpaca pups of different ages and 5 samples of newborn animals without ingestion of colostrum, to which real-time RT-PCR was performed. The products of the PCR and real-time RT PCR were sequenced to determine their specificity. The total DNA of the blood leukocytes was obtained using a DNA extraction kit to then perform a PCR with specific primers for each gene of the isoforms of the RXRalpha, RXRbeta and RXRgamma receptors, to be revealed by agarose gel electrophoresis. Total messenger RNAs (mRNAs) were obtained from the jejunum samples with the extraction kit of "SV total RNA isolation system" (promega) and treated with DNase, which served as a template to perform real-time RT-PCR with specific primers of the RXRalpha, RXRbeta and RXRgamma genes. The results allowed us to determine that the alpacas have the three RXR isoforms (alpha, beta and gamma) encoded in their genome and that they have different degrees of expression in the jejunal mucosa of alpaca pups. A high expression of RXRgamma and RXRbeta was detected; however, the expression of RXRalpha could not be determined. These results indicate that the RXRgamma and RXRbeta receptors are participating in the mucosal immune response in the jejunum of alpaca pups.

Key words: retinoic X receptors (RXR), PCR, real time RT PCR, jejunal mucosa, pups, alpaca.

## Índice de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Vitamina A- Retinol y sus metabolitos.	7
Figura 2: Técnicas tradicionales empleadas para evaluar la funcionalidad de RXR.	13
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos en PCR utilizando primers para RXRalfa.	25
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos en PCR utilizando primers para el gen RXRbeta.	26
Figura 5: RT PCR tiempo real de muestras de yeyuno de crías de alpaca de distintas edades.	27
Figura 6: Curva de Melting (Tm) del producto del gen RXRbeta.	27
Figura 7: Curva de Melting (Tm) del producto del gen RXRbeta.	27
Figura 8: Resultado del análisis de la secuencia RXRbeta mediante el programa NucleotideBlast.	28
Figura 9: Dendograma del gen RXRbeta de crías de alpaca provenientes de Marangani, Cusco-Perú (método Fast Minimum Evolution).	29
Figura 10: Dendograma del gen RXRbeta de crías de alpaca provenientes de Marangani, Cusco-Perú (método Neighbor joining).	30
Figura 11: Gel de agarosa al 1.5% mostrando los productos de PCR del gen RXRgamma.	30
Figura 12: RT PCR tiempo real de muestras de yeyuno de crías de alpaca de distintas edades.	31
Figura 13: Curvas de disociación o Temperatura de Melting (Tm) realizados con el set de Primers para el gen RXRgamma de la mucosa yeyunal de crías de alpaca.	32

Figura 14: Resultado del análisis mediante el programa Nucleotide Blast de la secuencia de RXRgamma	33
Figura 15: Dendograma del gen RXRgamma de crías de alpaca provenientes de Marangani, Cusco-Perú (método Fast Minimum Evolution).	34
Figura 16: Dendograma del gen RXRgamma de crías de alpaca provenientes de Marangani, Cusco-Perú (método Neighbor joining).	34

## Índice de cuadros

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1: Primers para RT PCR tiempo real.	20
Cuadro 2: Primers para secuenciamiento.	20
Cuadro 3: Primers para el gen RXRbeta.	20
Cuadro 4: Primers para el gen RXRgamma.	21
Cuadro 5: Secuencia del gen RXRbeta.	28
Cuadro 6: Secuencia del gen RXRgamma.	32



## Índice de anexos

	<b>Pág.</b>
Anexo 1: Alineamiento del gen RXRbeta por el programa NucleotideBlast.	50
Anexo 2: Alineamiento del gen RXRbeta por el programa NucleotideBlast.	50
Anexo 3: Alineamiento del gen RXRgamma por el programa NucleotideBlast.	51

# **I. Introducción**

El sistema inmune de los camélidos sudamericanos (CSA) se encuentra poco estudiado, sobre todo respecto a la respuesta inmune en la mucosa intestinal. Esta respuesta es importante en las crías de alpacas, ya que permiten establecer los mecanismos de reconocimiento de lo extraño y de tolerancia a nivel intestinal. El sistema inmune mucosal posee ciertas funciones principales como: proteger las membranas mucosales contra la colonización e invasión de agentes potencialmente peligrosos, prevenir la ingesta de antígenos sin degradar y evitar el desarrollo de respuestas inmunes potencialmente perjudiciales. (Holmgren y Czerkinsky, 2005).

La vitamina A es fundamental para la respuesta inmune de mucosas a nivel intestinal, ya que sus metabolitos regulan la respuesta inmune de la mucosa intestinal debido a la dependencia de las células linfoides al estímulo de sus metabolitos, siendo el más importante el ácido retinoico, el cual induce a los linfocitos B intraepiteliales a producir inmunoglobulina A (IgA). El reconocimiento del ácido retinoico es a través de los receptores retinoicos (RAR) y receptores X retinoicos (RXR), que se expresan en las células linfoides asociadas a la mucosa y otras células epiteliales. Los receptores de ácido retinoico se pueden dividir en 3 tipos de isoformas, RARs (alfa, beta y gama) y RXRs (alfa, beta y gamma), cuyas distribuciones son tejidos específicos (Niederreither y Dolle, 2008). El ácido retinoico (RA) ejerce sus efectos sobre la diferenciación, crecimiento celular y función exclusiva de estos receptores nucleares (Dawson *et al.*, 2008).

Se tiene establecido el genoma completo de la alpaca siendo muchos de sus genes predictivos por análisis bioinformático, pero no están confirmados en ensayos biológicos aún, faltando aún confirmar la presencia y expresión de los receptores X retinoicos (RXR) en la mucosa intestinal de las alpacas y determinar que isoformas de estos receptores se expresan en el tejido yeyunal; por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión de las isoformas de los receptores X retinoicos (RXR) en la mucosa yeyunal de las crías de alpacas. Este estudio trata de cubrir la falta de conocimiento de la respuesta inmune en la mucosa intestinal con el fin de manejar eficientemente esta respuesta, buscando mejorar la salud de las crías de alpacas.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Respuesta inmune

Todos los seres vivos interactuamos diariamente con diversas clases de microorganismos que pueden afectar nuestro desarrollo, causándonos diferentes tipos de patologías, este suceso se puede manifestar de dos maneras, la primera es dañando el tejido de manera directa, y la segunda es a través de la inducción a la respuesta inflamatoria de forma indirecta (Pamer, 2007).

El sistema inmune (RI) es el encargado de combatir a los microorganismos que invaden los tejidos del hospedero. Existen una serie de mecanismos comprendidos en la respuesta inmune, los cuales dependen uno del otro, empiezan actuar después de que el patógeno invade los tejidos. Existen dos tipos de respuesta: inmune innata e inmune adquirida. La respuesta innata viene a ser la primera que defiende al organismo frente a las infecciones, esta es mediada por diversos mecanismos que son rápidos e inespecíficos. Por el contrario, la RI adquirida, o también llamada adaptativa, se encarga de eliminar agentes patógenos en la etapa final de la infección, por ende se considera bastante específico (Akira *et al.*, 2006).

La inmunidad innata posee diversos mecanismos de defensa para la eliminación de patógenos, los cuales involucran una serie de eventos como son la vasodilatación, la fagocitosis del patógeno y leucocitos migrando hacia el área afectada, llamados conjuntamente como respuesta inflamatoria (Burmester, 2003). Además, tenemos las barreras físicas, químicas y celulares. Cada una de estas posee sus propios medios de defensa contra diferentes patógenos. En el caso de las barreras físicas, estas se ubican en el epitelio superficial y en las secreciones; las enzimas y péptidos antimicrobianos están dentro de las barreras químicas como principales componentes; Finalmente entre las barreras celulares tenemos las células dendríticas y macrófagos (Janeway *et al.*, 2003).

Luego de haberse dado la primera línea de defensa, el organismo debería proporcionar una reacción específica netamente. El sistema inmune adaptativo, cuenta con fuentes más específicas como lo son los linfocitos (linf) T y B, ambos son encargados de eliminar patógenos desencadenando vías de respuesta celular (linfT) y/o humoral (linf B), provocando la existencia de memoria de tipo inmunológica (Goldsby *et al.*, 2002; Burmester, 2003).

## 2.2 Inmunidad en mucosas

Todo organismo superior está constantemente expuesto a microorganismos provenientes del medioambiente en el cual viven y se desarrollan, por ende es aquí donde nuestras defensas provenientes del sistema inmune son necesarias para hacer frente a cualquier tipo de daño que causen estos microorganismos (Mayer, 2003).

Los microorganismos tienen a las superficies corporales (como la piel) y a las mucosas como principal puerta de ingreso hacia el organismo (Shanahan, 2000).

El tracto gastrointestinal es una de las primeras vías de ingreso para los diferentes microorganismos. Por ello, un complejo sistema de defensa se ha desarrollado en la mucosa intestinal. A pesar de ello, es importante que la respuesta no sea tan excesiva, pudiéndose así establecer tolerancia inmunológica en cierto grado de los microorganismos que habitan la flora normal del tracto gastrointestinal (Liu y Lefrançois, 2004; Kaiserlian *et al.*, 2005; Pabst *et al.*, 2007).

La primera barra de defensa que deben traspasar los microorganismos cuando ingresan al organismo es el sistema inmune innato (Kamysz *et al.*, 2003), este sistema realiza acciones no específicas e inmediata protección contra patógenos que al final no termina de generar memoria de tipo inmunológica contra estos (Phadke *et al.*, 2005).

El SI de mucosas comprende a la respuesta inmune innata, la cual posee diversas defensas fisicoquímicas en el tracto intestinal como los movimientos peristálticos, las secreciones biliares, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, y componentes como las células dendríticas (DC), células epiteliales, células polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), etc. (Oppenheim *et al.*, 2003), logrando de esta forma neutralizar a los patógenos y eliminarlos a través de las heces.

Existen moléculas de tipo glicoproteicas conocidas como receptores de reconocimiento de patrón (PRR), suelen encontrarse en la parte superficial de las células epiteliales, y tienen como objetivos vincularse con ciertas formas antigénicas presentes en los microorganismos patogénicos y promover una respuesta inmune contra estos agentes (Liu y Lefrançois, 2004).

En las superficie mucosal y en el tracto intestinal se produce la respuesta de anticuerpos basada en expresar Inmunoglobulina A secretoria (sIgA), la cual es producida por las llamadas células B que se encuentran activadas en la superficie epitelial.

## 2.3 Vitamina A

En la década de los años 20s, Mellanby y Green identificaron la vitamina A como un agente "antiinfeccioso" y muchos ensayos clínicos no controlados mostraron que la administración de suplementos de vitamina A puede reducir la morbilidad y mortalidad en infecciones respiratorias, sarampión, sepsis puerperal y muchas otras infecciones (Semba, 1999).

La vitamina A (Vit A) es la primera vitamina liposoluble y multifuncional implicada en una amplia gama de procesos biológicos y fisiológicos como el crecimiento, la diferenciación celular e interacciones célula-célula, y la visión, el crecimiento, la reproducción, la hematopoyesis e inmunidad, respectivamente (Leal y Trujillo, 2010). Su control sobre el sistema inmune y sus funciones son más pleiotrópicas no solo para el desarrollo, sino también para el destino funcional de casi todas las células involucradas en la inmunidad innata, protectora o reguladora. Esto es especialmente importante en el borde intestinal, donde la vitamina A se absorbe por primera vez.

La mayoría de los efectos de la vitamina A son ejercidos por su metabolito, el ácido retinoico (AR), que a través de la ligadura de los receptores nucleares controla la expresión transcripcional de los genes diana del AR.

Se ha demostrado en estudios *in vitro*, que muchas de las funciones de los macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T y B, son modulados por la Vit A y sus derivados (como el AR en especial) e inclusive ejercen un efecto regulador en la expresión y actividad de muchas enzimas como fosfolipasa A2 y el óxido nítrico sintasa, que participan en la reacción inflamatoria a patógenos (Devaux *et al.*, 2000).

En los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de la relación de la vitamina A y la inmunidad en tres aspectos importantes: primero, está el efecto en la restauración epitelial de las superficies respiratorias y gastrointestinal; segundo, se encuentra la estimulación de ciertos tumores inmunogénicos; y por último, tenemos la regulación genética a través de receptores nucleares (Catharine, 1992; Hoag *et al.*, 2002).

## 2.4 Ácido retinoico

Los metabolitos activos de la vitamina A, como el ácido retinoico, poseen diversas actividades biológicas que incluyen el rol en la visión, desarrollo embrionario, proliferación celular, diferenciación y muerte celular. El intestino, es el que se encarga de absorber y metabolizar la vitamina A en ácido retinoico (Xiao *et al.*, 2008).

La vitamina A tiene como metabolito derivado al ácido retinoico, que es sintetizado por las células dendríticas (CD) asociadas al intestino, como un factor estimulador del sistema inmune. El ácido retinoico existe en dos formas isoméricas, *cis* y *trans*, de las cuales la forma *trans* es metabólicamente más activa. (Ott y Lachance, 1979).

La tolerancia inmune intestinal es inducida en parte por el ácido retinoico, considerándose una señal reguladora clave (Wang *et al.*, 2010). A su vez, también permite la estimulación de las células dendríticas para la generación de células T reg (Sun *et al.*, 2007). Por esta razón, se ha asociado la presencia de ácido retinoico con el tropismo de células T y B en su migración hacia el intestino delgado, concepto denominado "homing" linfoide (Kim, 2008).

El ácido retinoico, en sus formas isoméricas *all-trans* y *9-cis*, se producen a partir de células del intestino tales como las células dendríticas que proporcionan una señal ambiental específica en el intestino y en los tejidos linfoides asociados, los receptores *homing* intestinales son inducidos en las células de una manera dependiente de antígeno y de ácido retinoico. El ácido retinoico es también una señal importante que induce a las células B productoras de Ig A. Las células T y B de alojamiento (*Homing*) en el intestino juegan un papel esencial en la protección del tracto digestivo frente a patógenos. Asimismo, el ácido retinoico es también requerido para la producción de los fagocitos maduros en la médula ósea. Por otro lado, el ácido retinoico induce un subconjunto de células T reguladoras FoxP3+ que es importante para el mantenimiento de la tolerancia inmune en el intestino. Por lo tanto, los retinoides proporcionan tanto señales reguladoras positivas y negativas para controlar adecuadamente el sistema inmune de la mucosa (Kim, 2008).

El ácido retinoico *all-trans* (ATRA, del inglés *all-trans* retinoic acid) es un regulador de genes y de células troncales hematopoyéticas, este tiene la capacidad de promover la retención de células troncales en cultivos celulares; además, de incentivar la progresión en la línea mieloide. (Chen *et al.*, 2008).

Estudios en ratones *knockout* indican que la actividad del receptor de ácido retinoico no es esencial para la hematopoyesis normal, pero tanto estudios *in vitro* como *in vivo* indican que estos receptores

pueden ser importantes modificadores/reguladores de precursores mieloides diferentes, incluyendo las células madre. Se han identificado genes diana que son regulados directa o indirectamente por los receptores de ácido retinoico, los cuales podrían estar altamente involucrados en la regulación mediada por retinoides en la mielopoyesis. Varios modelos *in vitro* de la hematopoyesis sugieren que la actividad transcripcional de los receptores de ácido retinoico es regulada por el desarrollo durante las diferentes etapas de la mielopoyesis (Collins, 2002).

Los isómeros de ácido retinoico se unen a sus receptores nucleares de dos distintas clases: los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X retinoides (RXR). El ATRA se une a los receptores heterodímeros RAR-RXR aumentando la transcripción de muchos genes codificando las moléculas coestimuladoras. (Hoag *et al.*, 2002).

Estos receptores le permiten al ácido retinoico estimular las diversas vías de transducción de señal a través de sus receptores. Los receptores de ácido retinoico se pueden dividir en RARs (alfa, beta y gamma) y RXRs (alfa, beta y gamma), cuyas distribuciones son tejidos específicos (Niederreither y Dolle, 2008).

La mayoría de las funciones de la vitamina A dependen del ácido retinoico, principalmente en sus formas isoméricas *all-trans* y *9-cis* (Kastner *et al.*, 1995), siendo la forma *trans* la más metabólicamente activa (Ott y Lachance, 1979). El AR se une a dos familias de receptores nucleares: los isotipos alfa, beta y gamma de los receptores del ácido retinoico (RAR) y los isotipos alfa, beta y gamma de los receptores X retinoides (RXR) (Hoag *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2004).

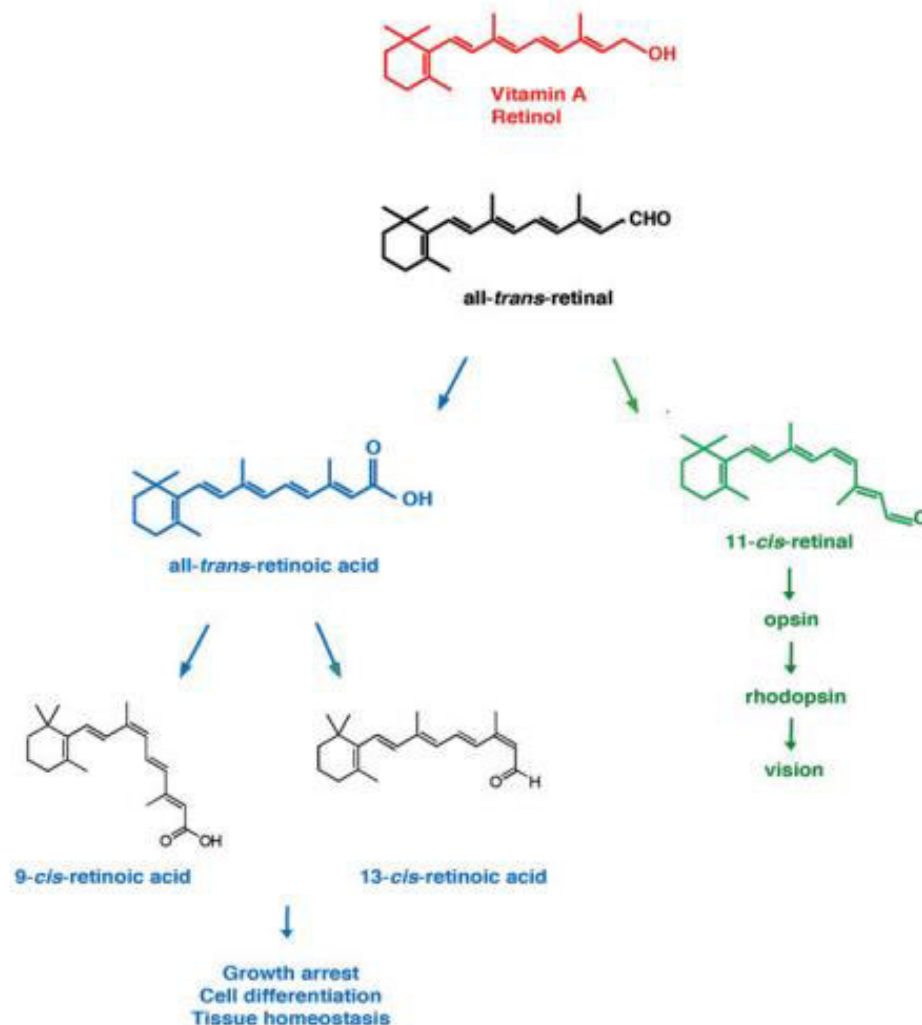
Se ha demostrado que ATRA y el ácido retinoico *9-cis* bloquean la apoptosis inducida por activación en timocitos. (O'Connell *et al.*, 1996).

## **2.5 Metabolismo de la vitamina A**

Últimos estudios revelaron que la vitamina A sirve como un precursor para los derivados activos que imparten dos efectos fisiológicos muy diferentes: (1) un derivado de aldehído (*11-cis* retinal), que es el cromóforo activo de la visión (Al Tanoury *et al.*, 2013) y (2): un derivado ácido (ácido retinoico *all-trans*), que tiene la capacidad de revertir los defectos de desarrollo en animales con deficiencia de vitamina A (VAD) (Arens y Van Dorp *et al.*, 1946). (Fig 1)

La vitamina A y sus derivados también influyen en la síntesis de ARN y proteínas; además, pueden unirse a proteínas intracelulares.





**Figura 1: Vitamina A - Retinol y sus metabolitos** (Benbrook *et al.*, 1988).

La estructura de la vitamina A, también conocida como retinol. Fue reportada por primera vez por Paul Karrer y sus colaboradores en 1931 (Semba, 2012), siendo confirmado por el grupo de Heilbron al año siguiente (Heilbron *et al.*, 1932), y cristalizado en 1937 (Holmes y Corbet, 1937). La molécula está compuesta por 20 átomos de carbono dispuestos como un anillo beta-ionona con una cola de isopreno conjugada que termina con un grupo funcional de alcohol.

Los estudios en curso revelaron que la vitamina A sirve como un precursor para derivados activos que imparten dos efectos fisiológicos muy diferentes: (1) un derivado de aldehído (11-*cis* retinal), que es el cromóforo activo de la visión (Al Tanoury *et al.*, 2013) y (2): un derivado ácido (ácido

retinoico all-*trans*), que tiene la capacidad de revertir los defectos de desarrollo en animales con deficiencia de vitamina A (VAD) (Van Dorp y Arens, 1946).

La Vitamina A tiene como metabolito principal al ácido retinoico (AR), es considerada como molécula endógena de bajo peso molecular (300 Da) que deriva del RO, es capaz de disolver las grasas y su distribución en los tejidos es mediada por enzimas que lo sintetizan y eliminan (Ott y Lachance, 1979).

El isómero 9-*cis*-ácido retinoico (9-*cis*-RA) del AR, actúa mediante receptores siguiendo una serie de eventos, primero este compuesto es transportado al núcleo por medio de la proteína celular de unión al ácido retinoico (CRABP). Es en este momento donde el ácido retinoico ejerce su influjo sobre la actividad génica del núcleo debido a su enlace con dos tipos de receptores nucleares, los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X retinoides (RXR). Son 3 especies que han sido las más estudiadas en este ámbito, la rata, el humano y el ratón, contando cada uno con tres tipos o isoformas de RAR (Alfa, Beta y Gamma) y tres de RXR (Alfa, Beta y Gamma), todos ellos cuentan con múltiples variaciones en sus genes, llamados variables. Por medio de la formación de heterodímeros (RAR/RXR) es cómo actúan los receptores que reconocen "elementos de respuesta al ácido retinoico" (RARE: Retinoic Acid Response Element) en secuencias del DNA (Lampen *et al.*, 2000).

La Vitamina A es metabolizada a nivel de las mucosas, principalmente en las células dendríticas, y produce preferentemente ácido retinoico (AR) que junto a otras citoquinas producidas localmente regulan la respuesta inmune intestinal a través de diferentes acciones inmunomoduladoras sobre los linfocitos y las células dendríticas (DCs) (Zeng *et al.*; 2013), asimismo se demostró que el AR controla también la generación DCs pre-mucosales (pre.u.DCs).

## **2.6 Ácido retinoico y el sistema inmune**

La falta de vitamina A se ha visto relacionada con el incremento de la susceptibilidad a adquirir infecciones virales, parasitarias y bacterianas, e incluso cuando la disponibilidad de vitamina A en los alimentos es baja, la inmunidad innata impide la regeneración normal de las barreras mucosales dañadas por la infección y por la disminución sobre la función de neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK) aumentando la severidad en enfermedades tipo infecciosas y el tiempo de permanencia de las mismas (Ross, 1992; Stephensen, 2001; Alvarez, 2008).

El rol que desempeña el ácido retinoico en la inmunidad innata esta evidenciada principalmente en la conservación epitelial del intestino, conocida por su actividad secretora de mucus asociada íntegramente como barrera física contra diferentes agentes patógenos presentes en el lumen intestinal (Montesano y Soulié, 2004; Grenier *et al.*, 2007).

La respuesta inmune intestinal es regulada por el ácido retinoico (AR) por medio de acciones que modulan el sistema inmune sobre las DCs y linfocitos. Las células dendríticas, que son las células presentadoras de antígenos más poderosas, juegan un papel importante en la defensa inmune intestinal. (Ping Dong *et al.*, 2010). En el 2013, se demostró que el ácido retinoico controla también la generación de células pre-dendríticas migratorias intestinales, denominadas DCs pre-mucosales (pre-u-DCs). La generación de estas células migratorias en la médula ósea (MO), ya sea *in vivo* o *in vitro*, está regulada por las señales producidas por el AR junto a su receptor RAR $\alpha$ . La frecuencia de estas células pre-mucosales se ve reducida en aquellos animales deficientes de vitamina A y en el uso de inhibidores de RAR en diversas especies (Zeng *et al.*, 2013).

La acción de la vitamina A y sus derivados (especialmente el ácido retinoico) sobre la función de las células linfoides, tales como macrófagos, polimorfonucleares (en especial neutrófilos), células NK, linfocitos T y B, ha sido demostrada *in vitro*; así como su participación en la síntesis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, 2, 3 y 4, TGF- $\beta$  y actividad de muchas enzimas como fosfolipasa A2 y óxido nítrico sintasa que participan en la reacción inflamatoria a patógenos (Devaux *et al.*, 2000). Todas estas acciones se deben a su metabolismo, en donde se producen los metabolitos que inducen diversas respuestas celulares. La vitamina A sirve como una prohormona de la que se derivan tres clases de metabolitos activos: los aldehídos, los ácidos carboxílicos, y los retro-retinoides.

Se ha encontrado que los retinoides tienen efectos beneficiosos en algunas enfermedades renales (Zhou *et al.*, 2011), incluida la glomeruloesclerosis; (Zhang *et al.*, 2012) sin embargo, los mecanismos celulares responsables de estos efectos renoprotectores siguen sin estar claros. En un modelo de rata con enfermedad renal poliquística (ERP), los genes relacionados con RXR que están implicados en la proliferación celular y en la morfogénesis de los órganos se expresaron aberrantemente al principio de la enfermedad, lo que sugiere que la señalización aberrante de RXR puede estar implicada en la cystogénesis de la ERP. La activación de los receptores RXR como parte del complejo RAR / RXR es silenciado en ausencia de ligandos RAR, un fenómeno denominado subordinación RXR. La participación de los receptores RXR es principalmente para mejorar la unión

de ADN del heterodímero, y la ligación simultánea de los receptores aumenta la activación transcripcional de los RAR (Germain *et al.*, 2002).

La expresión de estos receptores de ácido retinoico se examinó por primera vez en la mucosa intestinal de ratas normales y ratas con deficiencia de vitamina A (VAD) para evaluar que expresión del receptor está influenciada más por VAD utilizando un antagonista específico de RARα (Ro 41-5253) para eliminar el papel de RAR-α en la modulación del AR en la inmunidad de la mucosa intestinal. En la mucosa intestinal de las ratas VAD, el ARNm de RARα fue regulado negativamente, el número de células dendríticas (DC) aumentó, la secreción de IL-12 aumentó, pero la secreción de IFN-γ e IL-10 disminuyó. En las placas de Peyer cultivadas *in vitro*, el ácido retinoico (*all-trans*) promovió la maduración de DC, el ARNm de RARα fue regulado positivamente y la IL-12 e IFN-γ reducida, pero aumentó la expresión génica de IL-12. Estos efectos del ácido *trans*-retinoico (ATRA) se invirtieron cuando se cultivaron con Ro 41-5253 (un antagonista específico de RAR-α) (Dong, 2008).

La actividad de células T es regulada directa e indirectamente por el AR incluyendo el desarrollo de linfocitos Th 1 y Th2 y la apoptosis inducida por la activación de estos (Iwata *et al.*, 2004). La deficiencia de vitamina A disminuye la respuesta de anticuerpos mediada por las células Th2, a su vez también se ven disminuidos algunos aspectos de la inmunidad mediada por Th1. Estos cambios en la regeneración del epitelio de la mucosa y la función inmune, representan el aumento de la mortalidad observada en los lactantes deficientes de vitamina A, niños pequeños y mujeres embarazadas en muchas partes del mundo hoy en día (Stephensen, 2001).

A nivel de las células presentadoras de antígenos se ha evidenciado en múltiples estudios la capacidad de dicha célula para metabolizar la vitamina A (retinol) mediante la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa (RALDH) hacia ácido retinoico, de esta manera exportarla para ejercer un efecto inmunomodulador sobre los linfocitos (Duriancik *et al.*, 2010).

Tanto la evidencia clínica y experimental han demostrado que la poca cantidad de Vitamina A en el organismo está asociada a la disminución en la resistencia a infecciones. La deficiencia de vitamina A podría afectar a la inmunidad a través de una serie de mecanismos, incluyendo cambios en linfopoyesis y maduración de linfocitos, la producción anormal de citoquinas, afectando receptores para antígenos en las membranas, aumento de la penetración de bacterias, y parásitos a través de las barreras epiteliales, y deterioro de la eliminación de agentes patógenos por mecanismo citotóxicos y de fagocitosis (Ross, 1992). Las células epiteliales, que comprenden las células que cubren la piel y las membranas de las mucosas son el sitio de origen del 90% de todos los cánceres. Estos primeros

informes indican que las células madre no eran capaces de diferenciarse en células epiteliales maduras sin la presencia de la vitamina A (Dawson Y Zhang, 2002).

## **2.7 Receptores nucleares del ácido retinoico: RAR y RXR (RXRalfa, RXRbeta y RXRgamma)**

### **2.7.1 RAR**

El descubrimiento de los receptores del ácido retinoico surgió de la investigación sobre cómo las vitaminas son esenciales para la vida. Los primeros estudios indicaron que la vitamina A se metabolizó en un factor activo, el ácido retinoico (AR), que regula el ARN y la expresión de proteínas en las células (Asson-Batres y Rochette-Egly, 2014).

La manipulación del ADN y los estudios cristalográficos revelaron que los receptores contienen dominios funcionales discretos responsables de la unión al ADN, los ligandos y los cofactores. Se demostró que la unión de ligandos podría inducir de manera conformacional a variaciones en los receptores que causan la liberación de los coexpresores y el reclutamiento de coactivadores para crear complejos funcionales que se unen a secuencias de ADN promotoras de consenso llamadas elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) y que causan la apertura de la cromatina y la transcripción de genes (Asson-Batres y Rochette-Egly, 2014). Lo que demostró que los receptores exhiben funciones vitales en el desarrollo fetal y en la visión, reproducción y otras funciones necesarias para el mantenimiento de la vida adulta.

La función principal conocida del AR es la de regular la transcripción de genes a través de sus receptores nucleares, los cuales son RAR y receptores X retinoicos (RXRs) (Dawson Y Zhang, 2002).

Los receptores nucleares del ácido retinoico (RAR alfa, beta y gamma, también llamados NR1B1, NR1B2, NR1B3) son reguladores dependientes del ligando de transcripción, que median los efectos del ácido retinoico *all-trans*, el metabolito endógeno activo de la vitamina A. *En vivo*, RARs transducen la señal del ácido retinoico (RA) aheterodimeros con RXR y regulan la expresión de diversos genes implicados en el crecimiento celular y en el desarrollo. (Samarut y Rochette-Egly, 2012). Los RAR tienen efectos nucleares adicionales y activan vías de señalización (Bruck *et al.*, 2009). También se descubrieron los efectos nucleares no transcripcionales adicionales del AR y como se integran en el núcleo a través de un código después de la traducción de los RAR y sus co-reguladores.

RARs tiene una organización de dominios bien definida y estructura que consiste en un dominio N-terminal variable (NTD) y dos dominios bien estructurados y altamente conservados, un dominio de unión a ADN central (DBD) y un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) (Bastien y Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly y Germain, 2009). El DBD se compone principalmente de dos módulos de zinc-nucleado y dos hélices alfa, que se cruzan en ángulo recto y se pliegan en un único dominio globular. El LBD es más complejo, ya que está implicado en la unión al ligando, la dimerización y la interacción con múltiples correguladores. Está formado por 12 hélices alfa conservadas y un giro beta.

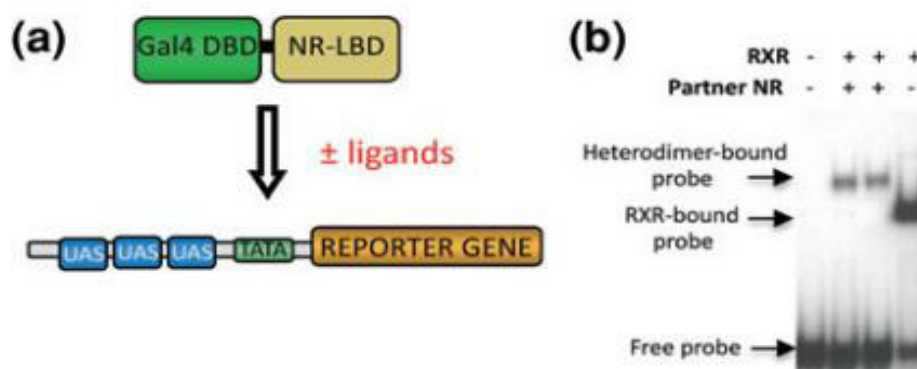
Sigue siendo desconocido si los receptores de RA (RARs) regulan los efectos protectores de la VA sobre la monocapa de células del epitelio intestinal.

### **2.7.2 RXR**

Una familia de proteínas que desempeña un papel clave en la respuesta celular a los estímulos internos y externos es la superfamilia de receptores de hormonas nucleares, que incluye los Receptores X Retinoides (RXR). Los RXR se describieron por primera vez en 1990 por Mangelsdorf *et al.*, como NR capaces de responder a los metabolitos de la vitamina A con un ligando específico para el 9-*cis* ácido retinoico (9-*cis*-RA). Estos receptores ocupan una posición central dentro de la superfamilia de receptores nucleares (NR), que actúan como socios obligatorios para muchos otros NR. Esta propiedad establece a los RXR en múltiples vías de señalización donde los NR desempeñan un papel de coordinación. La funcionalidad de los NR se facilita mediante dos dominios conservados en las proteínas: el Dominio de Enlace del ADN central (DBD) y el Dominio de Enlace del Ligando C-terminal (LBD). El DBD se requiere para la unión de NR a secuencias de ADN específicas. En ausencia de un ligando, los NR interactúan físicamente con los corresponsores de transcripción, como los co-represores del receptor nuclear y el mediador de silenciamiento del ácido retinoico y el receptor de la hormona tiroidea (NCOR1 y SMRT) (Chen y Evans, 1995), que desencadenan la represión de la expresión génica cuando están unidos al ADN. Tras la unión del ligando, los receptores experimentan un cambio conformacional que puede influir en su localización intracelular y / o su afinidad por las proteínas correguladoras, lo que aumenta el reclutamiento de coactivadores transcripcionales y la liberación de los corresponsores. Estos eventos promueven la interacción de los NR con un complejo inicio de la transcripción que conduce a la transcripción de los genes diana. De esta manera, los NR tienen la capacidad de modular la expresión génica en respuesta a una variedad de estímulos. Por lo tanto, RXR y sus ligandos tienen un papel fundamental en la modulación de muchas vías de señalización de tipo receptor-nuclear (Dawson Y Zhang, 2002).

La región LDB del RXR interactúa con la región del puente retinoide parece ser lipofílico en lugar de polar. (Dawson Y Zhang, 2002). En contraste con el DBD y LBD, el NTD no se conserva entre los RAR y RXR e incluso entre los diferentes subtipos e isoformas de un receptor dado.

La nueva evidencia generada a principios de la década de los 90's sugirió que también podría haber interacciones heterodímeras entre diferentes NR (Glass, 1994). En particular, se hizo evidente que los extractos nucleares de diferentes tipos de células contenían proteínas que eran necesarias para los NR, incluidos los receptores de ácido retinoico (RAR) (Govindan *et al.*, 1985), los receptores de hormona tiroidea (TR) (Burnside *et al.*, 1990) y los receptores de vitamina D (VDR) (Liao *et al.*, 1990), para unir el ADN con alta afinidad. Después de la identificación y la primera caracterización de los RXR, varios grupos demostraron de forma independiente que los RXR eran los factores faltantes comunes que formaban complejos heterodiméricos con RAR, TR y VDR (Bugge *et al.*, 1992). La capacidad de los RXR para formar heterodímeros se determinó utilizando el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Esta técnica evalúa la capacidad de los complejos proteínicos para unirse a secuencias específicas de ADN en un contexto in vitro (Fig 2). Los RXR también pueden formar homodímeros (Ijpenberg *et al.*, 2004). Los RXR juegan un único papel en la acción de la integración de varios NR mediante la formación de heterodímeros.



**Figura 2 (a y b): Técnicas tradicionales empleadas para evaluar la funcionalidad de RXR** (Desvergne y Gilardi, 2007).

(a) En los ensayos de transactivación, el LBD de RXR u otro NR se fusiona con el DBD de Gal4, un factor de transcripción derivado de la levadura. En presencia del ligando NR, la actividad transcripcional de Gal4 aumenta y el gen de expresión aumenta. (b) En los ensayos de cambio de



movilidad electroforética (EMSA), una sonda de ADN radiomarcada se incuba con el NR de interés y se carga en un gel. Si la NR se une a la sonda de ADN, la migración del ADN se retrasa y observando el cambio (sonda unida a RXR). También se revela la formación de un complejo heterodímero (sonda unida a heterodímero).

En el caso de los receptores RXR se refieren a sus 3 isoformas conocidas: RXRalfa, RXRbeta, RXRgamma. Según la clasificación oficial de los receptores nucleares, los RXR ahora se identifican como NR2B1 (RXR $\alpha$ ), NR2B2 (RXR $\beta$ ) y NR2B3 (RXR $\gamma$ ) (Feige *et al*, 2006). Las isoformas de un receptor dado son variantes N- terminales (Carrier y Rochette-Egly, 2015).

La identificación de los subtipos de RXR será más difícil debido a la mayor homología en sus lados LDB, en el caso de RXRbeta y RXRgamma, que son del 88% y 86% respectivamente, que para RXR alfa (Dawson Y Zhang, 2002).

El RXRs también heterodimerizan con el receptor de la vitamina D, el receptor de la hormona tiroidea, y muchos receptores huérfanos (Dawson Y Zhang, 2002).

La característica interesante de las proteínas RXR es que pueden activar la transcripción en respuesta al RA, pero son incapaces de unirse a la RA *all-trans* debido al hecho de que no comparten una homología significativa con la LBD de los RAR. En cambio, el ácido 9-cis retinoico se identificó como un ligando de alta afinidad para los RXR (Kliwer *et al.*, 1999). Sin embargo, hoy está claro que 9-cis-AR no se puede detectar en la mayoría de los tejidos, y aún se está investigando la existencia de un ligando RXR (Farsetti *et al.*, 1992). Sin embargo, varios compuestos sintéticos que se unen a los RXR y no a los RAR, los retinoides, se han diseñado y han proporcionado herramientas útiles (Mangelsdorf *et al.*, 1991).

### **2.7.2.1 RXRalfa**

En 1990, el grupo Evans informó sobre el descubrimiento del gen para el receptor nuclear RXR alfa (así llamada porque su ligando natural era entonces desconocido). La identificación y caracterización de la proteína correspondiente al gen RXR alfa fue reportado por el grupo Chambon. En ratones, existen tres variables para RXR $\alpha$  (RXR $\alpha$ 1, 2 y 3), que difieren en el dominio N-terminal, y se han caracterizado funcionalmente (Brocard *et al.*, 1996), y un cuarto subtipo ha sido predicho. La localización de sus diversas variantes se encuentran en diversos órganos en ratones, RXR $\alpha$ 1 es más

abundante en el hígado, pero también es altamente expresado en el riñón, bazo, placenta y epidermis. RXR $\alpha$ 2 y 3 son encontrados en los testículos de ratones adultos (Brocard *et al.*, 1996).

Los ensayos de cotransfección indicaron que 9-*cis*-AR activa tanto los RAR y RXR alfa, y así 9-*cis*-RA fue la primera RAR/RXR que se descubrió (Asson-Batres y Rochette-Egly, 2014).

### **2.7.2.2 RXRbeta**

En 1992, Mangelsdorf *et al.*, realizó un análisis de baja rigurosidad de las bibliotecas de cDNA de hígado y riñón humano utilizando una sonda correspondiente al DBD de RAR $\alpha$  y aisló un nuevo receptor nuclear, que era sustancialmente diferente de RAR $\alpha$  y se denominó hRXR $\alpha$  (Lefebvre *et al.*, 2010). Unos meses más tarde, el grupo de Michael Rosenfeld seleccionó una biblioteca de fagos de ADNc de un tumor de tiroides utilizando un elemento de respuesta RAR y aisló un receptor nuclear adicional, que mostraba una notable homología con RXR $\alpha$  y que difería en solo 2 aminoácidos de la proteína H-2RIIBP. Esta proteína finalmente se llamó RXR $\beta$  (Wahlstrom *et al.*, 1992). Se identificaron cuatro variables para el gen RXR $\beta$  (Liu y Linney, 1993; Lefebvre *et al.*, 2010). La localización del receptor RXR $\beta$  es ubicuo, con niveles más altos presentes en el sistema nervioso central (Bookout *et al.*, 2006).

### **2.7.2.3 RXRgamma**

Posteriormente, se aislaron tres RXRs murinos (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  y RXR $\gamma$ ) codificados por diferentes genes (Lee *et al.*, 2011). Varios estudios intentaron clonar el gen RXR $\gamma$  humano, pero sin resultados. Sin embargo, un locus genómico humano que codifica RXR $\gamma$  se ha mapeado en el cromosoma 1 utilizando hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (Altucci *et al.*, 2005). Se identificaron dos variables para el gen RXR $\gamma$  (Liu y Linney, 1993; Lefebvre *et al.*, 2010). La variable RXR $\gamma$ 1 se expresa en el músculo esquelético, bulbo olfatorio y glándula pituitaria, mientras que la variable RXR $\gamma$ 2 aparece tanto en el músculo cardíaco como en el músculo esquelético (Bookout *et al.*, 2006). En los humanos, el receptor RXR $\gamma$  está predominantemente en la glándula pineal (Wu *et al.*, 2009).

## 2.8 ALPACA

Las alpacas (*Vicugna pacos*) pertenecen a la familia Camelidae. Teniendo como parientes cercanos a los camélidos del mundo antiguo o viejo mundo. Los camélidos poseen características propias como rusticidad y adaptabilidad que les permite ser menos susceptibles a enfermedades que sí podrían afectar a otra clase de especies (Odbileg *et al.*, 2006).

El Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo con poco más de 5 millones de cabezas entre las cuatro especies (alpacas, llamas, guanacos y vicuñas), de las cuales 3.6 millones son alpacas y representan más del 85% de su población en el mundo (MINAGRI, 2006). La alpaca es considerada de suma importancia en la economía peruana sobre todo la andina, porque sirve como fuente de alimento, fibra y empleo para la gente que habita a más 4000 msnm (Bustanza, 2001). El hábitat de estos animales se localiza en los altos andinos, donde la agriculturano es posible.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración:**

El presente estudio se llevó a cabo en la sección de Inmunología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

El estudio fue llevado a cabo en el periodo comprendido entre Marzo del 2018 y Abril del 2019.

#### **3.2 Descripción del material experimental**

##### **3.2.1 Animales**

Se emplearon 5 alpacas adultas (sin distinción de sexo) que son criadas en las instalaciones de la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM a las que se les extrajo 5 ml de sangre en tubos con anticoagulante y que sirvieron para la obtención de ADN genómico.

Se utilizaron 35 yeyunos de crías de alpaca de diferentes días de nacidas entre los 0 a los casi 50 días.

Las muestras de yeyuno de las crías de alpacas fueron obtenidas en un muestreo de alpacas de un rebaño de la comunidad de Silly en Maranganí, Cusco-Perú en el año 2015, y fueron conservadas en nitrógeno líquido a -196°C.

### 3.2.2 Equipos e Instrumental

- Tanque de Nitrógeno líquido (-196°)
- Suero fisiológico al 0.9%
- Agua libre de nucleasas
- Cloroformo
- Microcentrifuga refrigerada
- Agitador Vórtex
- Etanol al 75%
- Tubos de 500 µl
- Crioviales de 2 ml
- Pipetas
- Gradillas
- Tubos Eppendorf de 2ml
- Termociclador a tiempo real (Equipo para PCR)
- Incubadora

### 3.2.3 Reactivos y Kits

- *Trizol® Reagent* (Invitrogen, USA): Solución monofásica de fenol con isotiocianato de guanidina.
- Kit "Gotaq PCR core system" (Promega)
- Kit "SV total RNA isolation system" (Promega)
- SuperScript™ III First Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, USA): Kit de transcriptasa reversa MuLV H+, con RNasa H+ de *E. coli*
- PureLink™ Genomic DNA Mini Kits (Invitrogen, USA)
- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)

### 3.2.4 Programas informáticos

- Software Primer blast
- Software de análisis de información iCycler
- Software 7500 For and Fast Real Time PCR version 2.0.6

- MS Word y MS Excel

### **3.3 Diseño experimental**

#### **Para la detección de genes RXR**

Se trabajaron 5 muestras de sangre entera (5ml) de alpacas adultas obtenidas por punción de la vena yugular en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA). Se formaron dos pool con dichas muestras, estas fueron centrifugadas en tubos Falcon a 2000 rpm por 5 min, obteniéndose tres capas: la capa superior transparente (capa plasmática), una capa inferior roja (capa eritrocítica), y una capa blanca intermedia (capa leucocítica). Se extrajo la capa leucocítica utilizando una pipeta Pauster y se colocó en tubos Falcon (rotulados) cada pool. Finalmente, se tomó 200 ul de cada uno de los tubos para determinar la presencia de los genes RXRalfa, RXRbeta y RXRgamma mediante PCR en el genoma de las alpacas muestreadas. El ADN genómico de cada tubo fue empleado para la reacción de PCR con el PureLink™ Genomic DNA Mini Kits (Invitrogen, USA). El ADN purificado fue almacenado a -20 ° C hasta su uso en la PCR convencional.

#### **Para determinar la expresión de los genes RXR en yeyuno**

Se trabajaron 35 muestras de intestino delgado (yeyuno) de crías de alpacas desde la primera hasta la sexta semana mantenidas en nitrógeno líquido a -196°C permanentemente desde el 2015.

Previamente durante el muestreo, los animales estudiados fueron sacrificados según el protocolo de Autorización N°2009-001 del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las muestras recolectadas del yeyuno fueron de 2 cm. Una vez rotuladas las muestras en su respectivo criovial, se almacenaron inmediatamente en el tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

#### **3.3.1 Elaboración de cebadores o primers**

Se usó el software Primer blast para la obtención de los primers de cada uno de los genes utilizando las secuencias establecidas en el Genbank como sigue:

### Gen código identificación Genbank

RXRa XM\_015250564

RXRb XM\_015237344.1

RXRg XM\_006209028.2

**Cuadro 1:** Primers para RT PCR tiempo real

Gen/ primer	Secuencia	Tamaño primer (pb)	Tamaño producto (pb)
RXRa pacos rtimesFor	GAGACGTATGTGGAGGCGAAT	21	207
RXRa pacos rtimesRev	GTGGGAGAAGGATGCGATGAG	21	
RXRb pacos rtimesFor	TATGTGCAATCTGCGGGGAC	20	115
RXRb pacos rtimesRev	CGGCATGAGTAGGTCAGGTC	20	
RXRg pacos rtimesFor	CTGGGCTCTCCGTATCGAGT	20	127
RXRg pacos rtimesRev	TGCTGACACTGTTGACCACAT	21	

**Cuadro 2:** Primers para secuenciamiento

Gen/ primer	Secuencia	Tamaño primer (pb)	Tamaño producto (pb)
RXRa pacos SecFor	ATGCGGAACCATTTCTGCCC	20	715
RXRa pacos SecRev	TTGGACACAAGCTCCGTCAG	20	
RXRb pacos SecFor	CCCCCTGAAGATGTGAAGCC	20	554
RXRb pacos SecRev	ATCCTCTTCGCCCCACTCAAC	20	
RXRg pacos SecFor	CCCATCGGCAGCCTTATCTAC	21	720
RXRg pacos SecRev	TTGGTGACAGGGTCATTCGT	20	

Se realizó un PCR semianidado teniendo como Primers:

**Cuadro 3:** Primers para el gen RXRbeta.

RXRb pacos rtimesFor	TATGTGCAATCTGCGGGGAC
RXRb pacos SecRev	ATCCTCTTCGCCCCACTCAAC

Teniendo un producto de 466 pb para el gen RXRbeta

**Cuadro 4:** Primers para el gen RXRgamma.

RXRg pacos rtimesFor	CTGGGCTCTCCGTATCGAGT
RXRg pacos SecRev	TTGGTGACAGGGTCATTCGT

Teniendo un producto de 608pb para el gen RXRgamma

Los productos del semianidado fueron secuenciados y analizados por el programa Nucleotide Blast para la identidad, y target loci para el análisis filogenético.

### 3.3.2 Procesamiento de las muestras

De las muestras que están almacenadas en nitrógeno líquido (-196°C), se realizaron cortes que pesaban 150 mg. Estas secciones fueron lavadas con suero fisiológico al 0.9% para luego realizar el machacado de las muestras. El machacado se reconstituyó con 500µl de agua libre de nucleasas. Se obtuvieron dos alícuotas por cada muestra y fueron conservadas en nitrógeno líquido a -196°C para luego ser utilizadas.

### 3.3.3 Extracción de ARN total

Con el fin de evaluar la expresión de diversas isoformas de los receptores X retinoicos (RXRs) en el yeyuno de las crías de alpaca se realizó la obtención de los ARN totales de cada muestra, procesándolas con 1ml del reactivo *Trizol®Reagent* (Invitrogen, USA). El procedimiento se basa en utilizar una solución monofásica de fenol con isotiocianato de guanidina para la ruptura de la membrana celular y así poder obtener dos fases de la muestra: una acuosa donde está el ARN total, y otra orgánica donde están el ADN y proteínas. Posteriormente, se precipita el ARN total con cloroformo e isopropanol de la fase acuosa y del ADN total de la fase orgánica. El ADN se diluye para su posterior uso.

Para obtener el ARN, la fase acuosa que contiene al ARN total es precipitada con cloroformo e isopropanol, la mezcla fue homogenizada mediante vortex y se le adiciono 200 µl de cloroformo, se agitará vigorosamente durante 15 segundos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12000 x g a 4°C por 10 minutos; Formándose 2 fases: la primera es la fase superior acuosa que contiene el ARN precipitado en cloroformo, y la segunda es la fase fenólica orgánica que contiene el ADN y trazas de proteínas desnaturalizadas. La primera



que fue la fase acuosa fue llevada a un nuevo tubo libre de nucleasas de 1.5 ml, luego se adicionó 500 µl de isopropanol el cual precipitó el ARN. Se centrifugó la mezcla a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y luego se eliminó el sobrenadante, dejando sólo el “pellet” de ARN. Se lavó con etanol al 75% frío y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Finalmente se procedió a disolver el pellet en 60 µl de agua libre de nucleasas, se trató con ADNasas incubándola por 30 minutos e inactivándola a 70°C por 15 minutos. Finalmente en tubos de 500 µl fueron alicuotadas, cada tubo contenía de ARN 30 µl y fueron almacenados hasta su procesamiento en nitrógeno líquido (-196°C).

El ARN obtenido se cuantificó usando el kit Quant-it™ (Invitrogen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando el fluorómetro de Qubit™ (Invitrogen, EEUU). Luego, se procedió a realizar diluciones en agua libre de nucleasas para trabajar con 1 µg en un volumen de 2 µl por muestra y usarla en el RT-PCR tiempo real.

### **3.3.4 PCR**

El PCR fue utilizado para identificar los genes de las isoformas de receptores retinoicos (RXRs) en ADN de leucocitos sanguíneos. Se usaron los primers diseñados para este trabajo y se utilizó el kit “Gotaq PCR coesystem” (Promega) con una desnaturalización inicial de 95°C por 2 minutos y 25–35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 42–65°C por 30 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto, una extensión final 72°C por 5 minutos y a 4°C indefinido. Los productos obtenidos fueron revelados en geles de agarosa al 1.5% por electroforesis a 80 voltios por una hora.

### **3.3.5 Síntesis de ADNc (Transcripción reversa)**

De las muestras procesadas se obtuvo el ARN de cada una, el cual se utilizó como base para la síntesis de ADNc (ADN complementario) empleando el kit “SV total RNA isolation system” (Promega), según las instrucciones del fabricante.

Cada material empleado estaba libre de nucleasas; Además, el lugar de trabajo, los materiales utilizados como parte del procesamiento y materiales de plástico no perecibles fueron irradiados con luz UV durante 12 horas como mínimo previas a su uso.

Para la síntesis de ADNc se prepararon componentes de la reacción como premezcla, tomando en consideración el total de muestras utilizadas y la parte final del volumen de cada muestra, se mezclaron ambos en tubos eppendorf de 2ml de capacidad.

Antes de su uso se mantuvo en hielo dicha premezcla, para prevenir que a temperatura ambiente la reacción diera inicio. De la síntesis de ADNc, los componentes tuvieron un último volumen de 20  $\mu$ l por reacción/muestra en sus concentraciones, estos serán agregados de la siguiente manera:

- a) 2xRT Reaction mix 10 $\mu$  x n\*
- b) RT enzyme mix 1 $\mu$ l x n
- c) Hexámeros al azar 1 $\mu$ l x n
- d) H<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l x n

\*donde “n” significa el número de muestras a trabajar.

En tubos individuales descartables de 200  $\mu$ l de capacidad con tapa incorporada se dispense 18  $\mu$ l del master mix para ser utilizados en el termociclador. Luego, se añadió en cada una de las muestras 2  $\mu$ l de ARN templado en cada tubo de modo que este último no pueda exceder el 10% del volumen final de la reacción. El termociclador qTOWER 2.2 (Analytik-jena) nos sirvió para el procesamiento de las muestras, este fue modificado con el protocolo a continuación: por diez minutos a 25°C, por treinta minutos a 50°C, al término de la reacción por cinco minutos a 85°C. Se añadieron 2 UI de RNAsa H+ de *E.coli* a cada pocillo y se incubó por veinte minutos a 37°C para deshacer la molécula híbrida de ARN a ADNc. Este último hasta utilizarlo en la reacción de RT-PCR Tiempo Real se mantuvo congelado a -70°C.

### **3.3.6 PCR a Tiempo Real.**

El ADNc previamente obtenido fue analizado mediante el PCR en tiempo real cuantitativo en triplicados usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). La cantidad inicial (SQ) de la muestra de ADNc inicial fue calculada de curvas estándar primer específicas usando el Software de Análisis de información iCycler. El nivel de expresión de cada gen será normalizado al nivel de expresión de GAPDH usando un método de curva estándar.

Se tuvieron en cuenta varias pautas de la PCR a tiempo real para cada uno de los genes, estas se dieron de la siguiente manera se utilizó 2 µl de RNA de muestra completando a 25 µl de volumen final con el bufer mix del kit SYBR GREEN ER qPCR Super Mix y el protocolo de 2 min a 50°C, por 10 min a 95°C (activación del ADN polimerasa), por 15 segundos a 95°C se dieron 45 ciclos seguido, y finalmente por 60 segundos a 60°C. Apenas termino el proceso, los tubos anteriormente mencionados se retiraron del termociclador y llevados a refrigeración a 4°C.

Se visualizaron los resultados a través del *software 7500 For and Fast Real Time PCR versión 2.0.6*, gracias a este software se obtuvieron los valores del Ciclo Umbral (Ct) y las temperaturas de disociación o Melting (Tm) de cada uno de los productos obtenidos en la PCR. Los amplicones emiten una fluorescencia al finalizar cada ciclo, llamado también extensión y empezar uno siguiente llamado desnaturalización, ambos se interpretan como “Temperatura de Melting”.

### **3.4 Análisis de la información**

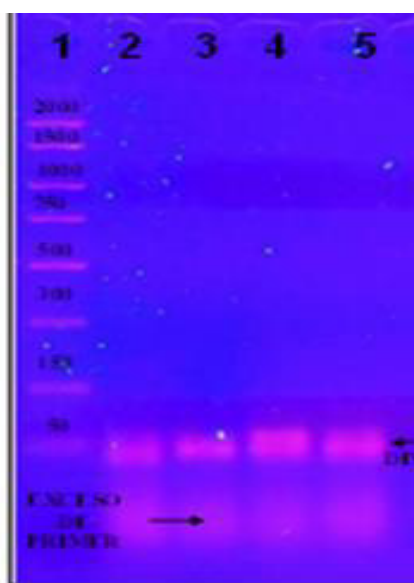
Las secuencias de los genes de los animales muestreados permitieron realizar el análisis filogenético mediante los métodos: Fast Minimum Evolution, el cual nos permite determinar la cercanía evolutiva de los genes en estudio, y el método Neighbor joining, el cual se utiliza para el análisis de secuencia y determinar la identidad y cercanía filogenética entre los individuos analizados.

## IV Resultados

### 4.1 Análisis del gen RXRalfa en alpacas.

#### ➤ Detección del gen RXRalfa en sangre de alpacas adultas.

El PCR con los primers diseñados para RXRalfa produjo una serie de productos inespecíficos que determinaron la presencia de bandas de distintos tamaños en el gel de agarosa, mas no la banda esperada de 715 pares de bases (pb) (Figura 3), por lo que no se pudo determinar la presencia del gen RXRalfa en el DNA genómico de los leucocitos de las alpacas adultas.



**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos en PCR de las isoformas de RXR teniendo como molde el ADN genómico de alpacas adultas. El carril 1 es el marcador de peso molecular, del carril 2 al 5 son ADN genómico de leucocitos de alpacas adultas.

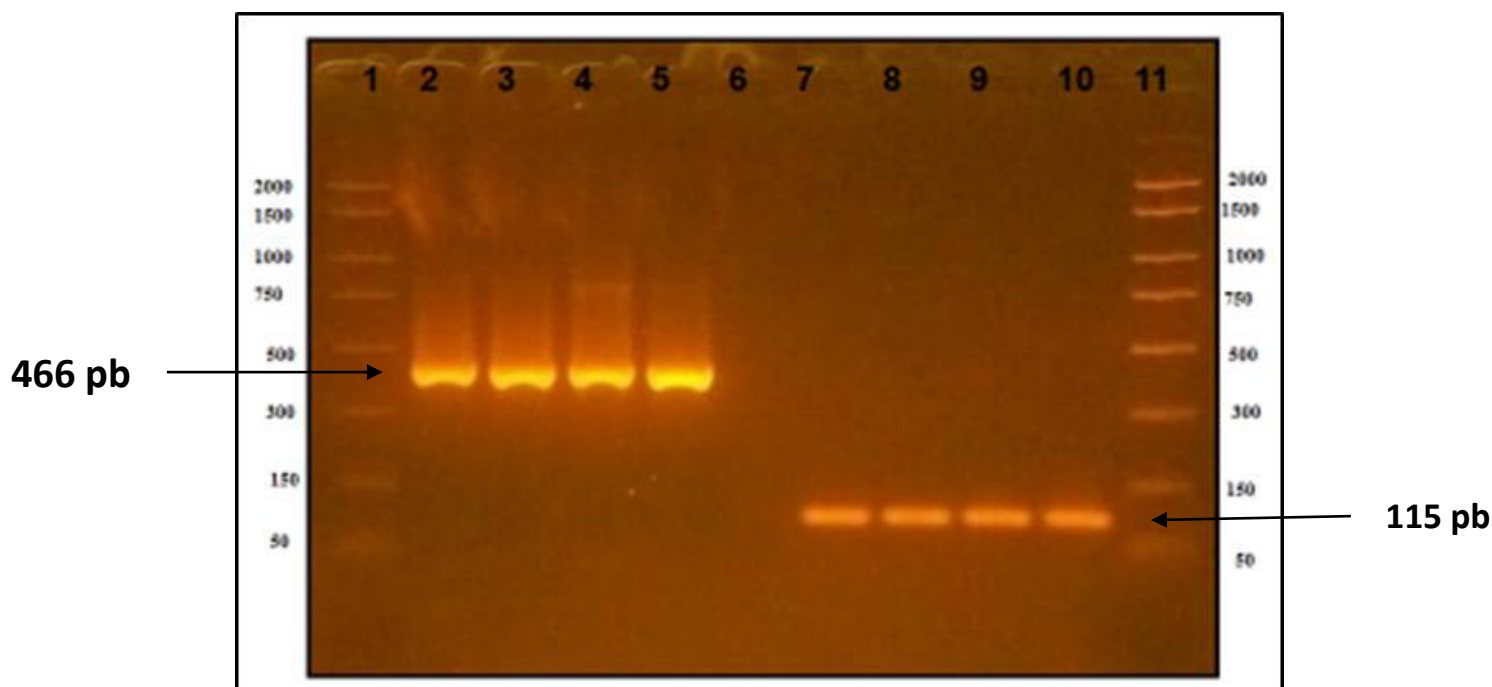
Debido a que no se determinó la presencia de RXRalfa en el genoma de las muestras procesadas, no se pudo continuar con su análisis.

## 4.2 Análisis del gen RXRbeta en alpacas.

### ➤ Detección del gen RXRbeta en sangre de alpacas adultas.

Se determinó la presencia del gen RXRbeta en el DNA genómico del pool de leucocitos de las alpacas adultas en estudio, observándose un producto único de 466 pares de bases (pb) de la PCR anidada en el gel de agarosa (figura 4).

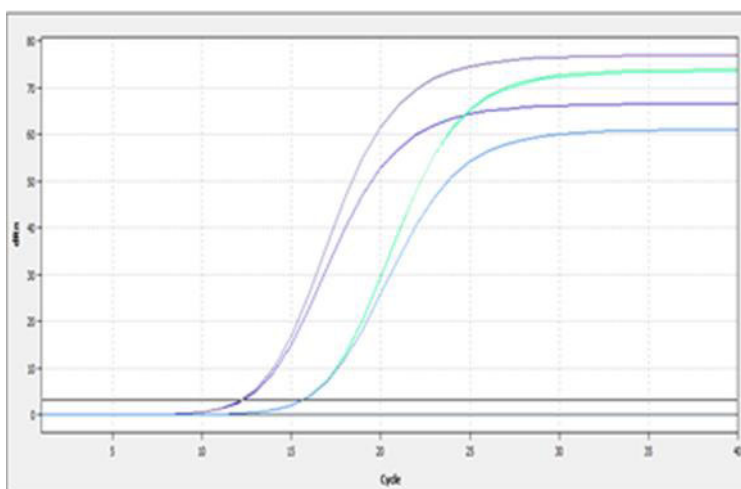
Se realizó un gel de agarosa del producto del RT- PCR tiempo real y se obtuvo un solo producto con 115 pb, determinando la especificidad de los primers diseñados.



**Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos del PCR utilizando primers para el gen RXRbeta (carril del 2 al 5) y los productos del RT-PCR (del carril 7 al 10)

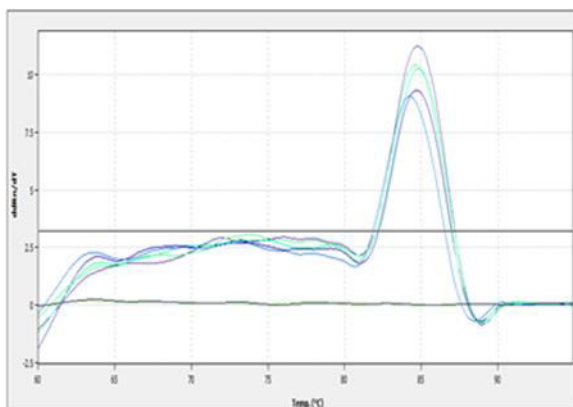
➤ **Expresión del gen RXRbeta en yeyuno de crías de alpaca.**

Se determinó la expresión del gen RXRbeta en la mucosa yeyunal de las crías de alpaca por RT PCR tiempo real en donde se observan curvas de amplificación (Ct) con valores que van de 13 a 16, indicando la presencia de distintas concentraciones de ARN mensajeros del gen RXRbeta en yeyuno de las crías de alpaca y determinando la expresión de este gen en el yeyuno de las crías de alpaca.

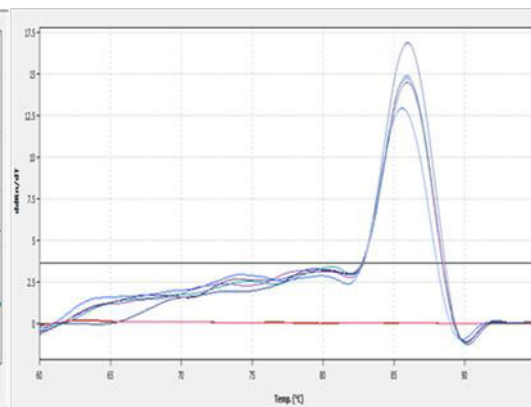


**Figura 5:** RT PCR tiempo real de muestras de yeyuno de crías de alpaca de distintas edades. Se observan curvas de amplificación (Ct) para el gen RXRbeta con un rango de 13 a 16.

La especificidad de cada producto del RT PCR tiempo real de muestras utilizadas de yeyuno se determinó con la Curva de Melting (Tm). Los resultados indican que las muestras tienen un solo producto (un solo pico de disociación) y posee un Tm de  $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , determinando que el RT PCR tiempo real es altamente específico para el producto esperado del gen RXRbeta (Figura 6 y 7).



**Figura 6**



**Figura 7**

**Figura 6 y 7:** Curva de melting (Tm) del producto del gen RXRbeta. Se calcula que la temperatura es de  $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

➤ **Secuenciamiento y análisis bioinformático del gen RXRbeta.**

El secuenciamiento del producto de la PCR utilizando los primers para el gen RXRbeta nos determinó una secuencia de 364 pares de bases (pb) en una alpaca que tuvo la mayor cantidad de producto en el RT PCR anidado (Cuadro5). El análisis de alineamiento para identificar la identidad del producto con el banco de datos de la NCBI (GenBank), determinó que la muestra tiene una alta identidad con el RXRbeta de *Camelus ferus* con un porcentaje de 99.72% (357/358) y una identidad del 98% (358/364) con la variante X1 de alpaca (*Vicugna pacos*) (GenBank XM\_015237344.1) (Figura 8).

**Cuadro 5:** Secuencia del gen RXRbeta. Esta secuencia fue obtenida del ADN genómico de leucocitos sanguíneos de 5 alpacas adultas.

```
5'_TCCGTAAGGACCTGACCTACTCATGCCGGGACAACAAAGACTGCACGGTGGACAAG
CGCCAGCGGAACCGCTGTCAGTACTGCCGCTATCAAAAGTGCCTGGCCACTGGCATGA
AGAGGGAGGCGGTACAGGAGGAGCGTCAGCGGGGGAAGGACAAAGATGGGGATGGG
GAGGGGGCTGGGGGAGCCCCTGAGGAGATGCCGGTGGACAGGATCCTGGAGGCAGAG
CTTGCTGTGGAGCAGAAGAGTGACCAGGGCGTTGAGGGTCCTGGGGGAACCGGGGGT
GGCGGCAGCAGCCCAAATGACCCAGTGACTAACATCTGTCAGGCAGCTGACAAGCAGC
TATTCACGCTTGTTGACT_3'
```

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:2

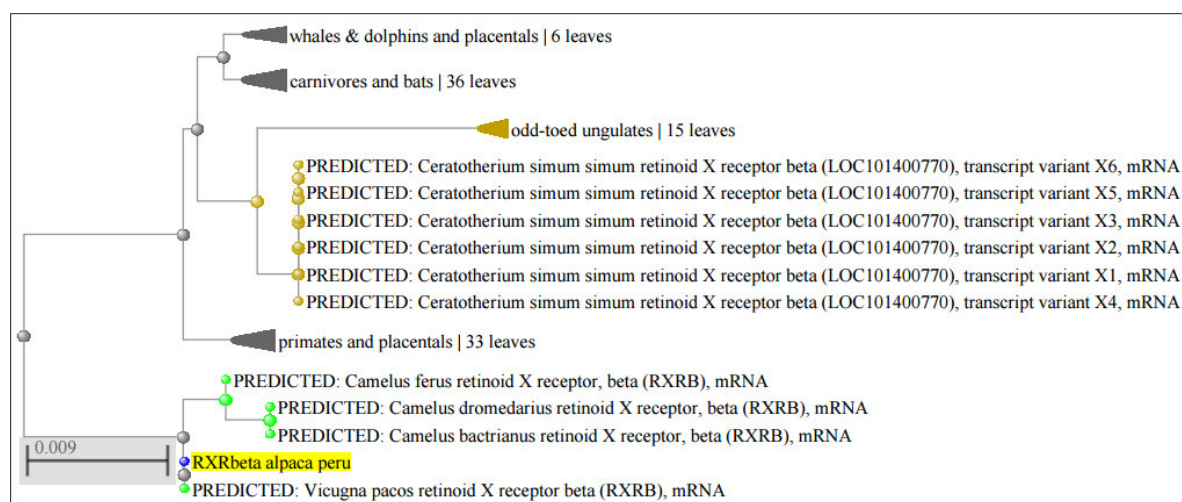
[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Camelus ferus retinoid X receptor, beta (RXRB), mRNA</a>	656	656	99%	0.0	99.72%	<a href="#">XM_014555717.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Camelus dromedarius retinoid X receptor, beta (RXRB), mRNA</a>	651	651	99%	0.0	99.44%	<a href="#">XM_010994570.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Camelus bactrianus retinoid X receptor, beta (RXRB), mRNA</a>	651	651	99%	0.0	99.44%	<a href="#">XM_010949102.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Vicugna pacos retinoid X receptor beta (RXRB), mRNA</a>	634	634	99%	7e-178	98.35%	<a href="#">XM_015237344.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X6, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_014782838.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X5, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_014782837.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X3, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_014782836.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X2, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_014782835.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X1, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_014782834.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Ceratotherium simum simum retinoid X receptor beta (LOC101400770), transcript variant X4, mRNA</a>	606	606	99%	1e-169	97.21%	<a href="#">XM_004424285.1</a>

**Figura 8:** Resultado del análisis de la secuencia de RXRbeta mediante el programa Nucleotide Blast.

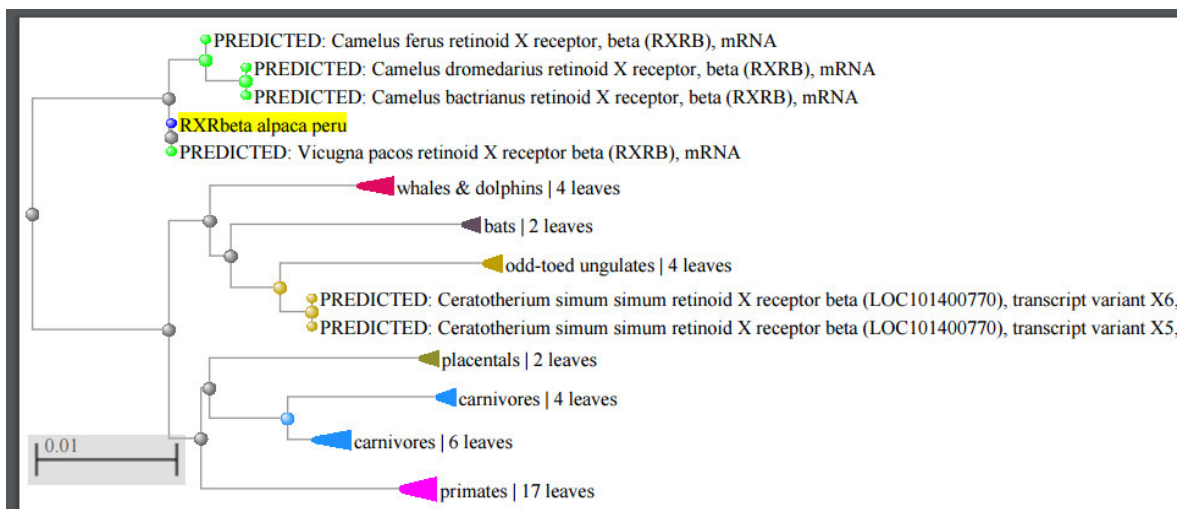
La secuencia fue obtenida del RT-PCR de la muestra de yeyuno de una de las crías de alpaca procedente de Marangani, Cusco-Perú.

El análisis filogenético se realizó utilizando secuencias nucleotídicas depositadas en el Genbank, estas fueron seleccionadas después de haber realizado el Blast de nuestra secuencia del gen RXRbeta (utilizando el programa Nucleotide Blast de alineamiento de múltiples secuencias online soportado por la NCBI). Con los métodos Fast Minimum Evolution y Neighbor joining se determinó que nuestra secuencia es filogenéticamente más próxima a las secuencias de alpaca variante 1 (*Vicugna pacos*) con un porcentaje identidad del 98.35%, y muestra un segundo nodo con los camélidos del viejo mundo o mundo antiguo (*Camelus ferus*, *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*) con un porcentaje de identidad de 99.72%. Fuera de estas especies observamos una relación filogenética cercana al gen de RXRbeta con los primates y animales placentarios, rinocerontes (*Ceratotherium simum*), mamíferos ungulados con dedos impares, carnívoros y murciélagos y más lejanos las ballenas y delfines (95.81% de identidad) (Figuras 9 y 10).



**Figura 9:** Dendrograma del gen RXRbeta de crías de alpaca provenientes de Maranganí, Cusco-Perú, con el método Fast Minimum Evolution. Max seq difference 0.1.



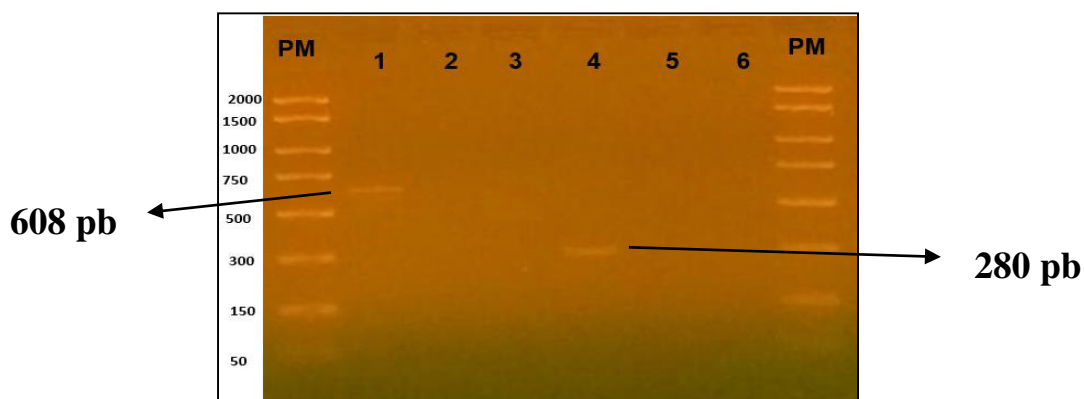


**Figura 10:** Dendrograma del gen RXRbeta de crías de alpaca provenientes de Marangani, Cusco-Perú con el método Neighbor joining. Max seq difference 0.1

### 4.3 Análisis del gen RXRgamma en alpacas.

#### ➤ Detección del gen RXRgamma en sangre de alpacas adultas.

Se determinó la presencia del gen RXRgamma en el DNA genómico del pool de leucocitos de las alpacas adultas en estudio observándose un producto único de 608 pares de bases (pb) de la PCR anidada en el gel de Agarosa (figura 11).

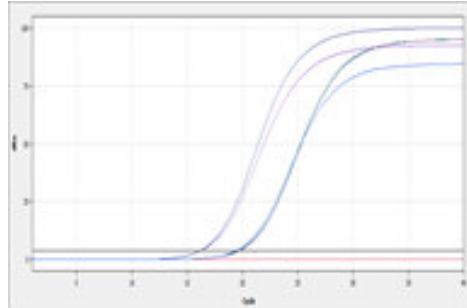


**Figura 11:** Gel de Agarosa al 1.5% mostrando los productos de PCR del gen RXRgamma. Cuenta con 604 pb usando DNA genómico como molde (carril 1) y un producto del RT PCR tiempo real del mismo gen de 280 pb usando ARN total de yeyuno de cría de alpaca (carril 4).

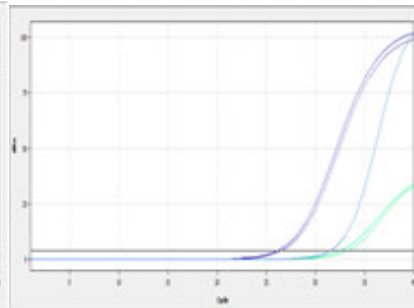
➤ **Expresión del gen RXRgamma en yeyuno de crías de alpaca.**

Se determinó la expresión del gen RXRgamma en el yeyuno de las crías de alpaca por RT PCR tiempo real en donde se observan curvas de amplificación (Ct) con valores que van de 16 a 20, indicando la presencia de distintas concentraciones de ARN mensajeros del gen RXRgamma en yeyuno de las crías de alpaca y determinando la expresión de este gen en el yeyuno de las crías de alpaca (figura 12). Los productos de RT PCR tiempo real fue corrido en gel de agarosa mostrando una sola banda de 280pb según lo esperado (figura 11).

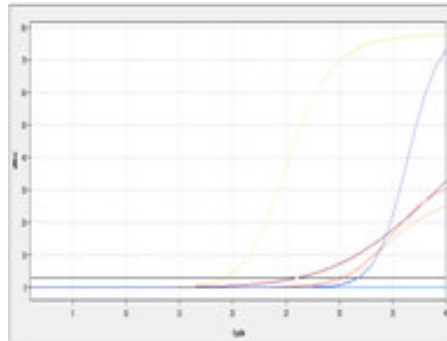
**Figura 12 a**



**Figura 12 b**

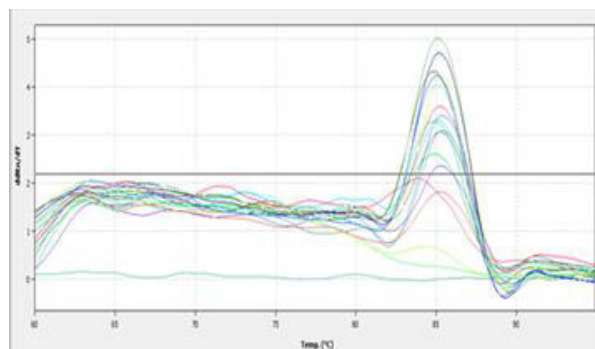


**Figura 12 c**



**Figura 12 (a, b y c):** RT PCR tiempo real de muestras de yeyuno de crías de alpaca de distintas edades. Se observan curvas de amplificación (Ct) para el gen RXRgamma con un amplio rango de 16 a 35.

La especificidad de cada producto del RT PCR tiempo real de muestras utilizadas de yeyuno se determinó con la curva de Melting (Tm). Los resultados indican que las muestras tienen un solo producto (un solo pico de disociación) y que están en rango de 83°C a 88°C de Tm, siendo la mayoría de 85°C, determinando que el RT PCR tiempo real es altamente específico para el producto esperado del gen RXRgamma (Figura 13).



**Figura 13:** Curvas de disociación o temperatura de Melting (Tm) realizados con el set de primers para el gen RXRgamma de la mucosa yeyunal de crías de alpaca. Los resultados tuvieron un rango de 83°C a 88°C.

➤ **Secuenciamiento y análisis bioinformático del gen RxRgamma.**

El secuenciamiento del producto de la PCR utilizando los primers de RXRgamma para tal fin nos determinó una secuencia de 534 pares de bases (pb) en un alpaca que tuvo la mayor cantidad de producto en el RT PCR anidado (Cuadro 6), que muestran una identidad de 99% (533/534) con la variante X1 del receptor gamma en alpacas (*Vicugna pacos*) (GenBank XM\_006209028.2) (Figura 14).

**Cuadro 6:** Secuencia del gen RXRgamma. Esta fue obtenida del ADN genómico de leucocitos sanguíneos de 5 alpacas adultas.

```
5'_TCAGGAGCACTGGCAGCCCCTCCAGGAATCAATTTGGTTGCCCCGCCAGCTCTCAG
CTAAATGTGGTCAACAGTGTGTCAGCATTTTCAGAGGACATCAAGCCCTTATCAGGGCTTCC
CGGCATCGGAAATATGAACTACCCGTCCACTAGCCCTGGCTCTCTGGTTAAACACATCT
GTGCCATCTGCGGGGACAGATCCTCAGGGAAGCACTATGGTGTGTACAGTTGTGAAGG
CTGCAAAGGGTTCTTCAAGAGAACCATAAGGAAAGACCTCATCTACACGTGCCGGGAC
AATAAAGACTGCCTCATTGACAAGCGCCAGCGTAACCGGTGCCAATACTGCCGCTATC
AGAAGTGCCTTGTGTCATGGGCATGAAGAGGGAAGCTGTGCAAGAAGAGAGGCAGAGAA
GCCGGGAGCGGGCAGAGAGTGAGGCGGAGTGTGCCAGCAGCGGCCATGAAGACATGC
CTGTGGAGAGGATTCTAGAAGCTGAACTTGCCGTTGAACCAAAGACGGAATCCTATGG
TGACATGAACATG-3'
```

Sequences producing significant alignments:

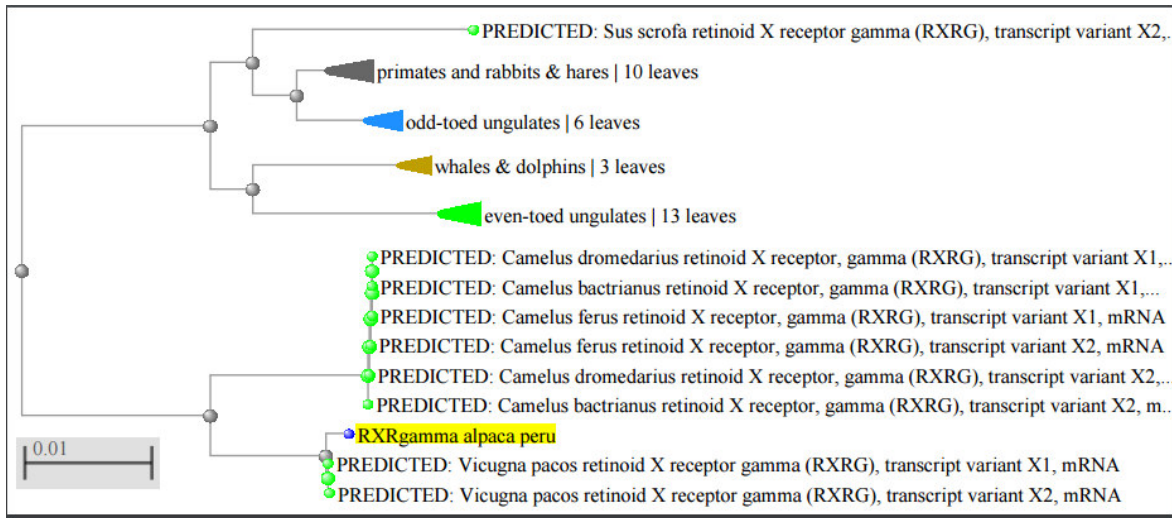
Select: [All](#) [None](#) Selected 0

Alignments [Download v](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

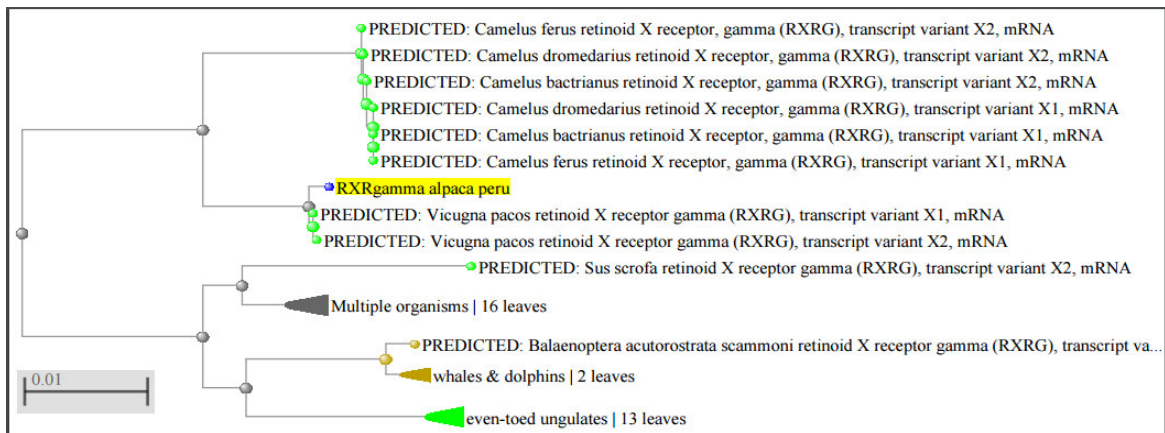
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vicugna pacos</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	969	969	100%	0.0	99.81%	<a href="#">XM_006208028.2</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Camelus dromedarius</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	902	902	99%	0.0	97.56%	<a href="#">XM_010384434.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Camelus bactrianus</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	902	902	99%	0.0	97.56%	<a href="#">XM_010353793.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Camelus ferus</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	902	902	99%	0.0	97.56%	<a href="#">XM_006175933.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vicugna pacos</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X2, mRNA	868	868	89%	0.0	99.79%	<a href="#">XM_006208029.2</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	829	829	100%	0.0	94.38%	<a href="#">XM_007191074.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sus scrofa</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X2, mRNA	820	820	100%	0.0	94.01%	<a href="#">XM_021088737.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sus scrofa</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	820	820	100%	0.0	94.01%	<a href="#">XM_013988076.2</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Lipotes vexillifer</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), mRNA	820	820	100%	0.0	94.01%	<a href="#">XM_007457395.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Ceratotherium simum simum</i> retinoid X receptor gamma (LOC101400065), transcript variant X2, mRNA	815	815	100%	0.0	93.82%	<a href="#">XM_014783301.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Ceratotherium simum simum</i> retinoid X receptor gamma (LOC101400065), transcript variant X1, mRNA	815	815	100%	0.0	93.82%	<a href="#">XM_004424844.2</a>
<input type="checkbox"/>	<i>Sus scrofa</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), mRNA	815	815	100%	0.0	93.82%	<a href="#">NM_001130213.1</a>
<input type="checkbox"/>	<i>Sus scrofa</i> retinoid X receptor gamma mRNA, partial cds	815	815	100%	0.0	93.82%	<a href="#">AY428474.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	810	810	100%	0.0	93.63%	<a href="#">XM_027098954.1</a>
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Neohocaea asiaeorientalis</i> retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA	810	810	100%	0.0	93.63%	<a href="#">XM_024741973.1</a>

**Figura 14:** Resultado del análisis mediante el programa Nucleotide Blast de la secuencia de RXRgamma. Esta secuencia se obtuvo del RT-PCR de la muestra de yeyuno de una de las crías de alpaca de Marangani, Cusco-Perú.

El análisis filogenético de la secuencia del gen RXRgamma de la cría de alpaca nos muestra un nodo con RXRgamma variante X1 y X2, y un nodo más lejano con los camélidos del viejo mundo. Nuestra secuencia es filogenéticamente más próxima a las secuencias de alpaca variante 1 (*Vicugna pacos*) con un porcentaje de identidad del 99.8%, y a la de los camélidos del antiguo mundo (*Camelus ferus*, *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*) con un porcentaje de identidad del 97.56% (figura 14). Fuera de estas especies observamos una relación filogenética cercana al gen de RXRgamma variante 1 de las siguientes especies: primates, conejos, porcinos (*Sus scrofa*), equinos, ballenas y delfines (figuras 15 y 16) con un rango de identidad de 93 a 94% (figura 14).



**Figura 15:** Dendrograma del gen RXRgamma de crías de alpaca provenientes de Maranganí, Cusco-Perú, con el método Fast Minimum Evolution. Max seq difference 0.1



**Figura 16:** Dendrograma del gen RXRgamma de crías de alpaca provenientes de Maranganí, Cusco-Perú, con el método Neighbor joining. Max seq difference 0.1.

## V DISCUSIÓN

En la presente investigación se determinó la presencia de los genes de los receptores X retinoicos (RXR) en el genoma de alpacas adultas y su expresión en la mucosa yeyunal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Se determinó la presencia del gen del receptor RXRbeta en los leucocitos sanguíneos de las alpacas adultas provenientes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, utilizando los primers diseñados en base al gen putativo RXRbeta XM\_015237344.1, lo cual confirmo que la predicción informática de este gen en el genoma de la alpaca es cierta.

El alineamiento de la secuencia obtenida del fragmento del gen RXRbeta indica que tiene una identidad alta (99.72%- 99.44%) de un fragmento de 358 nucleótidos con el gen RXRbeta de los camélidos del viejo mundo y con los camélidos sudamericanos un 98.35% de identidad pero con un fragmento mayor de 362 nucleótidos, indicando que el receptor es altamente conservado en las especies de los camélidos. Esta alta conservación es debido a que cumplen funciones muy variadas en la fisiología de la especie como es el control del desarrollo embrionario, diferenciación celular, y en mantener la homeostasis metabólica (Gronemeyer *et al.*, 2004; Sonoda *et al.*, 2008). Los primers usados en este trabajo no diferencian las variantes de RXRbeta que se han determinado en las especies animales (Nagataavb *et al.*, 1994; Keightley, 1998), teniendo alta identidad con las especies filogenéticamente más cercanas como los camélidos del viejo mundo (Wheeler, 1995)

El gen RXRbeta se expresó en el yeyuno de las crías de alpaca estudiadas. La literatura en humanos indica que la localización de expresión de este gen es ubicuo, con niveles más altos presentes en el sistema nervioso central (Liu y Linney, 1993; Lefebvre *et al.*, 2010). La expresión evidenciada por el gen RXRbeta posee diferentes niveles de expresión en las diversas muestras procesadas, este hecho puede deberse a que sus niveles de expresión varían con el tipo de célula y el estado de diferenciación. Estudios en humanos revelan que los RXR son evidenciados por todo el organismo, tanto en el embrión y como en el adulto (Lane y Bailey, 2005). Por ende podemos tener la certeza de que en el caso de las alpacas los receptores RXR junto a sus isoformas pueden estar ubicados en diversos órganos sobre todo en aquellos que cumplen las funciones fisiológicas por las cuales se destacan estos receptores.

Al determinarse la presencia del gen RXRbeta mediante electroforesis, se siguió con la metodología y se realizó el procesamiento de las muestras de yeyuno de las crías de alpaca mediante el RT PCR

tiempo real determinándonos la expresión del gen RXRbeta en el yeyuno de crías de alpaca, al finalizar con su procesamiento se observaron curvas de amplificación (Ct) con una variación que va de 13 a 16, indicando la presencia de distintas concentraciones de ARN mensajeros del gen RXRbeta en la mucosa yeyunal de crías de alpaca. Dicho acontecimiento nos determinó la expresión de dicho gen en las muestras evaluadas. La especificidad de los productos amplificados del gen en mención de las muestras de yeyuno se determinó mediante la Curva de Melting (Tm). Los resultados indican que las muestras tienen un solo producto (un solo pico de disociación) y posee un Tm con un rango de  $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , determinando que el RT PCR tiempo real es altamente específico para el producto esperado del gen RXRbeta.

El análisis filogenético indica que utilizando el RXRbeta en estudio nos da una cercanía filogenética con los camélidos del viejo mundo similar a los estudios filogenéticos utilizando otros marcadores genéticos como las inmunoglobulinas (Nguyen, 2002) y ADN mitocondrial (Stanley *et al.*, 1994). En este análisis podemos observar que el porcentaje de identidad que posee la especie *Vicugna pacos* con los camélidos del viejo mundo, especialmente con la especie *Camelus ferus*, en el que el porcentaje de identidad es de un 99% y en el caso de una variante de la especie *Vicugna pacos* el porcentaje de identidad fue de un 98%, cada uno tuvo un alto grado de similitud en sus pares de bases (pb) teniendo como resultado 357/358 pb y 358/364 pb, respectivamente (NCBI). Según los resultados del porcentaje podría decirse que los camélidos del viejo mundo tienen mayor similitud con la secuencia obtenida; Sin embargo al momento de evaluar la cantidad de pares de bases de cada especie mencionada podemos notar que a pesar de tener menor coincidencia la variante *Vicugna pacos* en sus pares de bases la cantidad final es mayor que en las pares de bases de los camélidos del viejo mundo. Por esa razón es que el porcentaje fue 1% menor al de los camélidos del viejo mundo. Lo que nos dejaría claro que ambas especies tienen una secuencia muy similar en cuanto al gen RXRbeta.

Dentro de la investigación también se pudo determinar la presencia del gen del receptor RXRgamma en los leucocitos sanguíneos de las alpacas adultas provenientes de Maranganí- Cusco, para este proceso se utilizaron los primers diseñados en base al gen putativo XM\_006209028.2, lo que nos confirmó que este gen, al igual que RXRbeta, está presente en el genoma de las alpacas. La ubicación del gen RXRgamma tampoco se encuentra estudiada en los cromosomas del genoma de la alpaca, como es en el caso de los camélidos en general. No obstante, si existen estudios sobre la localización del gen RXRgamma en humanos, el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 1 (banda q22 – q23) (Mangelsdorf *et al.*, 1992). El gen RXRgamma posee dos variables entre sus genes en el caso de los

ratones (Liu y Linney, 1993; Lefebvre *et al.*, 2010). La primera es la variable RXR $\gamma$ 1, se expresa en el músculo esquelético, bulbo olfatorio y glándula pituitaria, mientras que la segunda variable, RXR $\gamma$ 2, su expresión aparece tanto en el músculo cardíaco como en el músculo esquelético (Bookout *et al.*, 2006). En los humanos, RXR $\gamma$  está predominantemente en la glándula pineal (Wu *et al.*, 2009). Esta variabilidad que encontramos en las diversas isoformas del receptor RXR se debe a que cada gen puede dar lugar a diferentes variables por medio de empalmes alternativos y/o utilización de promotores alternativos (Asson-Batres y Rochette-Egly, 2014). Esto nos podría dar a entender que al existir una serie de variables para cada isoforma de RXR, los primers utilizados no podrían abarcar todas las variables existentes para cada isoforma, pero no solo influye el hecho de tener variables sino también la cantidad de variables y la especie de la que se hable, ya que cada especie puede tener la misma o diferente cantidad de variables para cada isoforma. Sin embargo, en los resultados se evidencio la presencia de RXRbeta y RXRgamma, lo cual nos indica que probablemente en el caso de alpacas, la cantidad de variables que poseen las dos isoformas mencionadas no sea muy alta, por lo que podemos decir que los primers utilizados sí pudieron abarcar esa cantidad de variables que se presentaron durante el procesamiento. En esta investigación se evidencio que el receptor RXRgamma tuvo una ligera mayor presencia en las muestras procesadas, que el receptor RXRbeta. Este hecho puede deberse a que el receptor RXRgamma tiene menor cantidad de variables que el receptor RXRbeta, lo cual fue evidenciado por los resultados mostrados.

Se determinó la expresión del gen RXRgamma en la mucosa yeyunal de crías de alpaca por RT PCR tiempo real, mediante este proceso se pudieron observar curvas de amplificación (Ct) con valores que van de 16 a 20, indicando la presencia de distintas concentraciones de ARN mensajeros del gen RXRgamma en yeyuno de las crías de alpaca y determinando la expresión de este gen en las muestras utilizadas. No se pudo realizar una cuantificación relativa de la expresión de los genes RXR por no contar con el calibrador adecuado ni el gen normalizador (housekeeping) para utilizar el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que es el empleado para esta cuantificación (Dheda *et al.*, 2004).

La especificidad de los productos amplificados del gen RXRgamma fue comprobada por existir concordancia en los valores respectivos de temperatura de Melting (Tm). Estos valores tuvieron un rango de 83°C a 88°C para el gen RXRgamma, indicando que los primers permiten la polimerización de más de una isoforma de RXRgamma. En este caso la mayoría de las muestras tenían un promedio de temperatura de 85°C, sugiriendo que las muestras evaluadas mantienen una similitud en cuanto a la temperatura de disociación (Tm). La expresión de los RXRbeta y RXRgamma en la mucosa intestinal concuerda con su participación en la regulación del sistema inmune de mucosas



principalmente en el establecimiento de las células linfoides en el intraepitelio intestinal en donde se sugiere que la activación de RXR mejora la expresión dependiente de RAR de CCR9 en las células T y su capacidad de retorno al intestino delgado (Takeuchi *et al*, 2010)

El alineamiento de la secuencia obtenida del fragmento del gen RXRgamma indica que tiene una identidad muy alta de 99.8%, teniendo un fragmento de 533 de un total de 534 nucleótidos con el gen RXRgamma en el caso de los camélidos sudamericanos, en especial con la variante X1 *Vicugna pacos*. Para el caso de la identidad en los camélidos del viejo mundo, esta fue de 97.56% con un fragmento menor de 329 nucleótidos (NCBI), indicando que el receptor tiene un alto grado de conservación en las especies de los camélidos. Esto quiere decir que el contenido Guanina-Citosina (G-C), la secuencia de los genes y el tamaño de los amplicones es similar entre ambos (Dawson y Xia, 2014).

No fue posible determinar la presencia del receptor RXRalfa en el genoma de las alpacas, debido a que en el proceso de electrofresis, el gel de agarosa se evidenció bandas bastante inespecíficas y ninguna tuvo el tamaño esperado (715 pb). Este receptor es el más expresado en los otros mamíferos y donde existe muchas isoformas, así en ratones, existen tres variables para RXRalfa (RXR $\alpha$ 1, RXR $\alpha$ 2 y RXR $\alpha$ 3), que difieren en el dominio N-terminal, y se han caracterizado funcionalmente (Brocard *et al.*, 1996; Nunez *et al.*, 2010). Esta inespecificidad de los primers indica que no son los mas indicados para detectar al gen y sus isoformas por lo cual se deben diseñar otros primers más específicos abarcando una región de alta conservación para los genes del receptor RXRalfa y que permitan diferenciarlos de los receptores RXRbeta y RXRgamma ya que estos comparten una alta similitud entre ellos (Li *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2010).

Finalmente para comprender bien la biología de RXR, será fundamental juntar las técnicas innovadoras utilizadas para analizar la estructura de las proteínas e interacciones con los nuevos enfoques de todo el genoma de las diversas especies, ya que esto permitirá una amplia evaluación de las isoformas de RXR y sus efectos en la expresión de todos los genes diana. (Asson-Batres y Rochette-Egly, 2014)

## **VI CONCLUSIONES**

1. Se determinó la presencia de los genes RXRbet y RXRgamma en las alpacas oriundas del Perú.
2. No se pudo detectar el gen RXRalfa ni su expresión.
3. RXRbeta y RXRgamma se expresan en la mucosa yeyunal de crías de alpaca.
4. RXRbeta y RXRgamma de las alpacas del Perú tienen alta homología con los camélidos del viejo mundo.

## **VII SUGERENCIAS**

1. En futuros estudios serian recomendable trabajar con muestras frescas o que estas no pasen de un año de conservación en nitrógeno líquido, ya que el mantenimiento de estas podría verse afectado por cambios bruscos de temperatura durante el tiempo en el que se mantengan almacenados.
2. Es necesario establecer las variantes de cada isoforma RXR en camélidos para obtener primers más específicos para estos receptores. Sobre todo para el receptor RXRalfa que fue el que no se llegó a expresar.

## VIII LITERATURA CITADA

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124:783-801.
2. Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. 2013. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. Thematic review Series: Fat – Soluble Vitamins: Vitamin A. *J Lipid Res* 54: 1761-1775.
3. Altucci L, Rossin A, Hirsch O, Nebbioso A, Vitoux D, Wilhelm E, Guidez F, De Simone M, Schiavone EM, Grimwade D, Zelent A, De The H, Gronemeyer H. 2005. Retinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. *Cancer Res* 65:8754-8765.
4. Asson-Batres MA, Rochette-Egly C. 2014. The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. 230p
5. Alvarez L. 2008. Efecto de la suplementación con Vitamina A sobre los niveles de citosinas proinflamatorias y química sanguínea en adultos sanos. Tesis de Biología. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 73 p.
6. Arens JF, Van Dorp DA. 1946. Biological activity of vitamin A acid. *Nature* 158:60.
7. Bastien J, Rochette-Egly. 2004. Receptores nucleares retinoides y la transcripción de genes diana retinoides. *Gene* 328:1-16.
8. Benbrook D, Lernhardt E, Pfahl M. 1988. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333:669-672.
9. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu R, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126:789-799.
10. Brocard J, Kastner P, Chambon P. 1996. Two novel RXR $\alpha$  isoforms from mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 229:211-218.
11. Bruck N, Vitoux D, Ferry C, Duong V, Bauer A, de The H, Rochette-Egly C. 2009. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR $\alpha$  to target promoters. *EMBO J* 28:34-47.
12. Bugge TH, Pohl J, Lonnoy O, Stunnenberg HG. 1992. RXR $\alpha$ , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO J* 11: 1409-1418.
13. Burmester G, Pezzutto A. 2003. Color Atlas of Immunology. George Thieme Verlag. Stuttgart – Germany. 322p.

14. Burnside J, Darling DS, Chin WW. 1990. A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements. *J Biol Chem* 265:2500-2504.
15. Bustinza V. 2001. La Alpaca I: Conocimiento del Gran Potencial Andino. Primera Edición. Instituto de Investigación y Promoción de Camélidos Sudamericanos. Puno – Perú.p.15.
16. Carrier M, Rochette-Egly C. 2015. Control de la expresión genética por receptores nucleares del ácido retinoico: mecanismos reguladores post-traduccionales y epigenéticos. *Genómica funcional y Departamento de Cáncer. Universidad de Estrasburgo, Illkirch-Francia.* 110 p.
17. Catherine R.1992. Vitamin A status: Relationship to immunity and the antibody response. *Poc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 303-320.
18. Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J.* 10:940-954.
19. Chen X, Esplin B, Garrett K, Welner R, Webb C, Kincade P. 2008. Retinoids accelerate B lineage Lymphoid Differentiation. *J. immunol.* 180: 138-145.
20. Chen JD, Evans RM. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
21. Collins SJ. 2002. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis *Leukemia* 16(10):1896-1905.
22. Dawson MI, Zhang X-K. 2002. Descubrimiento y diseño del receptor del ácido retinoico y receptor X retinoico y análogos sintéticos selectivos de los subtipos *all-trans*-ácido retinoico y *9-cis*-ácido retinoico. Departamento de química médica, Instituto de Medicina molecular. Mountain View, California-EEUU. 632p.
23. Dawson MI, Xia Z. 2014. The retinoid X receptors and their ligands. *BiochimBiophys Acta.* 1821(1): 21-56.
24. Dawson H, Collins G, Pyle R, Key M, Taub D. 2008. The retinoic acid Receptor- $\alpha$  mediates Human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production. *BMC Immunology.* 9 (16): 1-14.
25. Dheda K, Huggett J, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques.* 37: 112–114.
26. Desvergne B.2007. RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. In: Gerald L (ed) *Vitamins and hormones.* Academic Press, New York.
27. Devaux Y, Grosjean S, Seguin C, David C, Dousset B, Zannad F, Meistelman C, De Talancè N, Mertes P, Ungureanu-Longris D. 2000. Retinoic acid and host-pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1045-E1053.

28. Dong C. 2008. Th 17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Natures review Immunology* 8 (5): 337-48.
29. Duriancik D, Lackey D, Hoag K. 2010. Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells. *Journal of Nutrition*. 140: 1395-1399.
30. Evans DV.1990.The wide-spacing approximation applied to multiple scattering and sloshing problems, *Journal of Fluid Mechanics*. 210:647-658.
31. Farsetti A, Desvergne B, Hallenbeck PL, Robbins J, Nikodem VM.1992. Characterization of the myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J Biol Chem* 1992. 267:15784-15788.
32. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45:120-159.
33. Germain P, Iyer J, Zechel C, Gronemeyer H. 2002. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415:187–92.
34. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H.2006. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptor. *Pharmacol Rev*. 58 (4): 760-72.
35. Glass CK.1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407.
36. Goldsby R, Kindt T, Kuby J, Osborne B.2002. *ImmunologyFifthEdition*.
37. Govindan MV, Devic M, Green S, Gronemeyer H, Chambon P.1985. Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. *NucleicAcids Res*. 13: 8293-8304.
38. Grenier E, Schwalm F, François J, Seidman E, Delvin E, Sane A, Tremblay E, Garofalo C, Levy E.2007. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J PhysiolGastrointestLiverPhysiol*. 293: 1178-1189.
39. Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudet V. 2004. Principles for modulation of the nuclearreceptor superfamily. *Nat RevDrugDiscov*. 3(11): 950-64.
40. Heilbron IM, Morton RA, Webster ET.1932. The structure of vitamin A. *Biochem J*. 26:1194-1196.

41. Hoag K, Nashold F, Goverman J, Hayes C.2002. Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. *The Journal of Nutrition*. 132:3736-3739.
42. Holmes HN, Corbet RE.1937. A crystalline Vitamin A concentrate. *Science*. 85:103.
43. Holmgren J, Czerkinsky C .2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*. 11:45-53.
44. Ijpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, Metzger D, Canaple L, Chambon P, Wahli W, Dervergne B. 2004. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J*. 23: 2083-2091.
45. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY.2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 21(4):527-528.
46. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M.2003. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Publishing. 5th Edition. 910p.
47. Kaiserlian D, Cerf-Bensussan N, Hosmalin A.2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections *J. Leukoc. Biol*. 78: 311-318.
48. Kamysz W, Okrój M, Lukasiak J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides.
49. Kastner P, Mark M, Chambon P.1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83(6):859-869.
50. Keightley MC.1998.Steroid receptor isoforms: exception or rule? *Mol Cell Endocrinol*.137: 1-5.
51. Kim CH.2008. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *EndocrMetab Immune Disord Drug Targets* 8(4):289-294.
52. Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM.1999. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284:757-760.
53. Lampen A, Meyer S, Arnhold T, Nau H.2000. Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestine enterocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 295:979-985.

54. Lane M, Bailey S. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75(4): 275-293.
55. Lázaro R, Manchego A, Pezo D, More J, Castro G, Siuce J, Sandoval N. 2015. Efecto de antígenos de *Clostridium perfringens* ácido retinoico sobre la expresión de IgA en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) *Rev. Investig. Vet. Perú* vol.26 n°4 Lima.
56. Leal L, Trujillo C. 2010. respuesta inadecuada a los patógenos y otros agresores: ¿deficiencia de Vitamina A?. *Iatreia* 23:373-385.
57. Lee JM, Lee YK, Mamrosh JL, Busby SA, Griffin PR, Pathak MC, Ortlund EA, Moore DD. 2011. A nuclear receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature*. 474:506-510.
58. Lefebvre B, Benomar Y, Guedin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, Bouchaert E, Dacquet C, Nicaud L, Casteilla L, Pattou F, Ktorza A, Staels B, Lefebvre P. 2010. Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPAR gamma in obese mice and humans. *J Clin Invest*. 120:1454-1468.
59. Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. 2010. Retinoid X receptors: common Heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol Metab*: TEM 21: 676-683.
60. Li D, Yamada T, Wang F, Vulin AI, Samuels HH. 2004. Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *J Biol Chem* 279:7427-7437.
61. Liao J, Ozono K, Sone T, McDonnell DP, Pike JW. 1990. Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:9751-9788.
62. Liu Q, Linney E. 1993. The mouse retinoid-X receptor-gamma gene: genomic organization and evidence for functional isoforms. *Mol Endocrinol* 7:651-658.
63. Liu Z, Lefrançois L. 2004. Intestinal Epithelial Antigen Induces Mucosal CD8 T cell Tolerance, Activation and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology* 173: 4324-4330.
64. Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative genes expression data using Real Time Quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta C_t$  Method. *Elsier Science* 25:401112-408.



65. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229.
66. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kilewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. 1991. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66:555-561.
67. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou J, Ong ES, Oro A, Kakizuka A, Evans RM. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6:329-344.
68. Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.
69. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Internet], [29 de mayo del 2019]. Disponible en: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
70. Mayer L. 2003. Mucosal Immunity. *Pediatrics*. 111: 1595-1600.
71. MINAGRI. 2006. Plan nacional de desarrollo ganadero 2006-2016. [Internet], [20 de abril del 2019]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal>
72. Montesano R, Soulié P. 2004. Retinoids induce lumen morphogenesis in mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 115:4419-4431.
73. More J. 2013. Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 104pp.
74. Nagataavb T, Kannob Y, Ozatob K, Taketo M. 1994. The mouse Rxrb gene encoding RXRP: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene*, 142:183-189.
75. Niederreither K, Dollé P. 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature's review genetics* 9 (7): 541-553.
76. Niess J, Brans S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick B, Vyas J, Boes M, Ploeg H, Fox J. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell Access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307 (2005), pp.254-258.

77. Nguyen V, Su Ch, Muyldermans S, Van der Loo W . 2002. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*. 54:39–47
78. O`Connell MJ, Chua R, Hoyos B, Buck J, Chen Y, Derguini F, Hammerling U. 1996. Retro-retrinooids in regulated cell growth and death. *J Exp Med* 184(2): 549-555.
79. Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M.2006.
80. Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defenses in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.*62:17-21.
81. Ott D, Lachance P. 1979. Retinoic acid – a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:2522-2531.
82. Pamer E.2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol* 8(11):1173-1178.
83. Pabst O, Bernhardt G, Förster R. 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J. Leukoc. Biol.* 82:795-800.
84. Ping D, Yuehong T, Yang Y, Wang W.2010. Expresión de receptores del ácido retinoico en la mucosa intestinal y el efecto de la Vitamina A sobre la inmunidad de la mucosa. Elsevier. *J. Nut.* 26(10): 740-745.
85. Rochette-Egly C, Germain P.2009. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. *NuclReceptSignal*. 7:e005.
86. Rojas M, Manchego A, Rocha CB, Fornells LA, Silva RC, Mendes GS, Dias HG, Sandoval N, Pezo D, Santos N.2016. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *J Infect Dev Ctries*. 31;10(3):269-274.
87. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK.2006. Sensors anda signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev*. 20:1405-1428.
88. Ross A.1992. Vitamin A: Relationship to immunity and the antibody response. *Proc Soc Exp Biol Med*. 200:303-320.

89. Samarut E, Rochette-Egly C. 2012. Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *J. Mce. Epub.* 348(2):348-6.
90. Shanahan F. 2000. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278:G191-196.
91. Semba RD. 1999. Vitamin A as “anti-infective” therapy, 1920–1940. *J. Nutr.* 129:783–91.
92. Semba RD. 2012. On the ‘discovery’ of vitamin A. *Ann NutrMetab.* 61:192-198.
93. Sonoda J, Pei L, Evans RM. 2008. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBSLett.* 582 (1): 2-9.
94. Stanley H, Kadwell M, Wheeler J. 1994. Molecular Evolution of the Family Camelidae: A Mitochondrial DNA Study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 256(1345), 1–6.
95. Stephensen CB. 2001. Vitamina A, infección y función inmune. *Annu Rev Nutr.* 21:167-192.
96. Sun C, Hall J, Blank R, Bouladoux N, Oukka M, Moa J, Belkaid Y. 2007. Small intestine lamina propria of dendritic cells promote a new generation of Foxp3+ T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204(8):1775-1785.
97. Takeuchi H, Yokota A, Ohoka Y, Kagechika H, Kato C, Song SY, Iwata M. 2010. Efficient Induction of CCR9 on T Cells Requires Coactivation of Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors (RXRs): Exaggerated T Cell Homing to the Intestine by RXR Activation with Organotins. *J Immunol* 185 (9): 5289-5299
98. Wahlstrom GM, Sjoberg M, Andersson M, Nordstrom K, Vennstrom B. 1992. Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. *Mol Endocrinol* 6.
99. Wang C, Kang SG, HogenEsch H, Love PE, Kim CH. 2010. Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine. *J Immunol.* 184(10):5519-5526.
100. Wei D, Yang Y, Wang W. 2007. The expression of retinoic acid receptors in lymph nodes of young children and the effect of all-trans-retinoic acid on the B cells from lymph nodes. *J Clin Immunol*: 27:88-94.

101. Wheeler J.1995. Evolution and present situation of the South American camelidae. Biological Journal of the Linnean Society. 54 (3):271-295.
102. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Btalov S, Hodge C, Haase J, Janes J, Huss J, Su A. 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. GenomeBiol10:R130. [Internet], [20 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://Biogps.org>.
103. Xiao S, Jin H, Korn T, Liu S, Oukka M, Lim B, Kuchroo V. 2008. Retinoic Acid increases Foxp3+ regulatory T cells. And inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- $\beta$  driven smad 3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. J.Immunol. 181:2277-2284.
104. Zeng R, Oderup C, Yuan R, Lee M, Habtezion A, Hadeiba H, Butcher EC.2013. Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. Mucosal Immunol 6(4): 847-856.
105. Zhang J, Pippin JW, Vaughan MR, Krofft RD, Taniguchi Y, Romagnani P, Nelson PJ, Liu ZH, Shankland SJ. Nephron Exp Nephrol. 2012; 121:e23. [PubMed: 23107969].
106. Zhou TB, Qin YH, Lei FY, Su LN, Zhao YJ, Huang WF. Exp Mol Pathol. 2011; 90:287. [PubMed: 21385580].
107. Zhou X, Wang W, Yang Y. 2008. The expression of retinoic acid receptors in thymus of Young children and the effect of all-trans-retinoic acid on the development of T cells in thymus. J Clin Immunol; 28:85-91.

## IX ANEXOS

**Anexo 1:** Alineamiento del gen RXRbeta por el programa Nucleotide Blast. Mostrando una identidad del 99% con la especie *Camelus ferus*.

Download <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					
PREDICTED: Camelus ferus retinoid X receptor, beta (RXRB), mRNA					
Sequence ID: <a href="#">XM_014555717.1</a> Length: 2337 Number of Matches: 1					
Range 1: 301 to 658 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Next Match</a> <a href="#">Previous Match</a>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
656 bits(355)	0.0	357/358(99%)	0/358(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TCCGTAAGGACCTGACCTACTCATGCCGGGACAACAAAGACTGCACGGTGGACAAGCGCC	60			
Sbjct 301	TCCGTAAGGACCTGACCTACTCATGCCGGGACAACAAAGACTGCACGGTGGACAAGCGCC	360			
Query 61	AGCGGAACCGCTGTCTAGTACTGCCGCTATCAAAAGTGCCTGGCCACTGGCATGAAGAGGG	120			
Sbjct 361	AGCGGAACCGCTGTCTAGTACTGCCGCTATCAAAAGTGCCTGGCCACTGGCATGAAGAGGG	420			
Query 121	AGGCGGTACAGGAGGAGCGTCAGCGGGGAAGGACAAGATGGGGATGGGGAGGGGGCTG	180			
Sbjct 421	AGGCGGTACAGGAGGAGCGTCAGCGGGGAAGGACAAGATGGGGATGGGGAGGGGGCTG	480			
Query 181	GGGGAGCCCTGAGGAGATGCCGGTGGACAGGATCCTGGAGGCAGAGCTTGCTGTGGAGC	240			
Sbjct 481	GGGGAGCCCTGAGGAGATGCCGGTGGACAGGATCCTGGAGGCAGAGCTTGCTGTGGAGC	540			
Query 241	AGAAGAGTGACAGGGCGTTGAGGGTCTGGGGGAACCGGGGGTGGCGGCAGAGCCCAA	300			
Sbjct 541	AGAAGAGTGACAGGGCGTTGAGGGTCTGGGGGAACCGGGGGTGGCGGCAGAGCCCAA	600			
Query 301	ATGACCCAGTGACTAACATCTGTCAGGCAGCTGACAAGCAGCTATTACGCTTGTTGA	358			
Sbjct 601	ATGACCCAGTGACTAACATCTGTCAGGCAGCTGACAAGCAGCTATTACGCTTGTTGA	658			

**Anexo 2:** Alineamiento del gen RXRbeta por el programa Nucleotide Blast. Mostrando una identidad del 98% con la especie *Vicugna pacos*.

Download <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					
PREDICTED: Vicugna pacos retinoid X receptor beta (RXRB), mRNA					
Sequence ID: <a href="#">XM_015237344.1</a> Length: 2895 Number of Matches: 1					
Range 1: 855 to 1218 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Next Match</a> <a href="#">Previous Match</a>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
634 bits(343)	7e-178	358/364(98%)	6/364(1%)	Plus/Plus	
Query 1	TCCGTAAGGACCTGACCTACTCATGCCGGGACAACAAAGACTGCACGGTGGACAAGCGCC	60			
Sbjct 855	TCCGTAAGGACCTGACCTACTCATGCCGGGACAACAAAGACTGCACGGTGGACAAGCGCC	914			
Query 61	AGCGGAACCGCTGTCTAGTACTGCCGCTATCAAAAGTGCCTGGCCACTGGCATGAAGAGGG	120			
Sbjct 915	AGCGGAACCGCTGTCTAGTACTGCCGCTATCAAAAGTGCCTGGCCACTGGCATGAAGAGGG	974			
Query 121	AGG-----CGGTAC-AGGAGGAGCGTCAGCGGGGAAGGACAAGATGGGGATGGGGAGG	174			
Sbjct 975	AGGAGAAGCGGTACAGGAGGAGCGTCAGCGGGGAAGGACAAGATGGGGATGGGGAGG	1034			
Query 175	GGGGTGGGGGAAGCCCTGAGGAGATGCCGGTGGACAGGATCCTGGAGGCAGAGCTTGCTG	234			
Sbjct 1035	GGGGTGGGGGAAGCCCTGAGGAGATGCCGGTGGACAGGATCCTGGAGGCAGAGCTTGCTG	1094			
Query 235	TGGAGCAGAAGAGTGACAGGGCGTTGAGGGTCTGGGGGAACCGGGGGTGGCGGCAGCA	294			
Sbjct 1095	TGGAGCAGAAGAGTGACAGGGCGTTGAGGGTCTGGGGGAACCGGGGGTGGCGGCAGCA	1154			
Query 295	GCCCAATGACCCAGTGACTAACATCTGTCAGGCAGCTGACAAGCAGCTATTACGCTTG	354			
Sbjct 1155	GCCCAATGACCCAGTGACTAACATCTGTCAGGCAGCTGACAAGCAGCTATTACGCTTG	1214			
Query 355	TTGA	358			
Sbjct 1215	TTGA	1218			

**Anexo 3:** Alineamiento del gen RXRgamma por el programa Nucleotide Blast. Mostrando una identidad del 99% con la especie *Vicugna pacos*.

Download ▾ GenBank Graphics					
PREDICTED: Vicugna pacos retinoid X receptor gamma (RXRG), transcript variant X1, mRNA					
Sequence ID: <a href="#">XM_006209028.2</a> Length: 2165 Number of Matches: 1					
Range 1: 673 to 1206 GenBank Graphics ▾ Next Match ▴ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
981 bits(531)	0.0	533/534(99%)	0/534(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TCAGGAGCACTGGCAGCCCTCCAGGAATCAATTGGTTGCCCCGCCAGCTCTCAGCTA	60			
Sbjct 673	TCAGGAGCACTGGCAGCCCTCCAGGAATCAATTGGTTGCCCCGCCAGCTCTCAGCTA	732			
Query 61	AATGTGGTCAACAGTGTTCAGCATTTCAGAGGACATCAAGCCCTTATCAGGGCTTCCCGGC	120			
Sbjct 733	AATGTGGTCAACAGTGTTCAGCATTTCAGAGGACATCAAGCCCTTATCAGGGCTTCCCGGC	792			
Query 121	ATCGGAAATATGAACTACCCGTCCACTAGCCCTGGCTCTCTGGTTAAACACATCTGTGCC	180			
Sbjct 793	ATCGGAAATATGAACTACCCGTCCACTAGCCCTGGCTCTCTGGTTAAACACATCTGTGCC	852			
Query 181	ATCTGCGGGGACAGATCCTCAGGGAAGCACTATGGTGTGTACAGTTGTGAAGGCTGCAAA	240			
Sbjct 853	ATCTGCGGGGACAGATCCTCAGGGAAGCACTATGGTGTGTACAGTTGTGAAGGCTGCAAA	912			
Query 241	GGGTTCTTCAAGAGAACCATAAGGAAAGACCTCATCTACAGTGCCGGGACAATAAAGAC	300			
Sbjct 913	GGGTTCTTCAAGAGAACCATAAGGAAAGACCTCATCTACAGTGCCGGGACAATAAAGAC	972			
Query 301	TGCCTCATTGACAAGCGCCAGCGTAACCGGTGCCAATACTGCGCTATCAGAAGTGCCTT	360			
Sbjct 973	TGCCTCATTGACAAGCGCCAGCGTAACCGGTGCCAATACTGCGCTATCAGAAGTGCCTT	1032			
Query 361	GTCATGGGCATGAAGAGGGAAGCTGTGCAAGAAGAGAGGCAGAGAAGCCGGGAGCGGGCA	420			
Sbjct 1033	GTCATGGGCATGAAGAGGGAAGCTGTGCAAGAAGAGAGGCAGAGAAGCCGGGAGCGGGCA	1092			
Query 421	GAGAGTGAGGCGGAGTGTGCCAGCAGCGGCCATGAAGACATGCCCTGTGGAGAGGATTCTA	480			
Sbjct 1093	GAGAGTGAGGCGGAGTGTGCCAGCAGCGGCCATGAAGACATGCCCTGTGGAGAGGATTCTA	1152			
Query 481	GAAGCTGAACCTTGGCGTTGAACCAAAGACGGAATCCTATGGTGACATGAACATG	534			
Sbjct 1153	GAAGCTGAACCTTGGCGTTGAACCAAAGACGGAATCCTATGGTGACATGAACATG	1206			